



# Tesis Doctoral

Estudio Experimental de Quimioprevención  
del Cáncer Colorrectal con el inhibidor  
específico de la Ciclooxygenasa-2, Rofecoxib.

Autor:

M<sup>a</sup> Asunción Pérez Sánchez.

Director:

Prof. Luis C. Capitán Morales.

Departamento de Cirugía  
Facultad de Medicina  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, 2015.





**D. Luis Capítan Morales, Profesor Titular de Universidad adscrito al Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de Sevilla,**

**CERTIFICA, que D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Asunción Pérez Sánchez, Licenciada en Medicina y Cirugía por la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado “Estudio Experimental de Quimioprevención del Cáncer Colorrectal con el inhibidor específico de la Ciclooxygenasa-2, Rofecoxib”, y que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.**

En Sevilla a 9 de Diciembre de 2015.





A quien pueda interesar:

El Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla, habiendo examinado el Proyecto “Quimiopprofilaxis de carcinoma colónico con Rofecoxib, inhibidor de la Ciclooxygenasa -2” presentado por D. Luis Capitán Morales emite el siguiente informe,

El proyecto cumple los requisitos exigidos para experimentación en sujetos humanos y en animales, y se ajusta a las normativas vigentes en España y en la Unión Europea.

Sevilla, a 07 de noviembre de 2010.

EL PRESIDENTE DEL COMITE,

Fdo.: Prof. Dr. Fernando Rodríguez Fernández.



*A mis padres.*

*A Jose, mi marido.*

*Sin tí, no lo habría conseguido.*

*A mi hijo Alejandro.*

*Sois mi vida.*

# AGRADECIMIENTOS

---

Mi mayor agradecimiento a mi Director de Tesis, el Prof. Dr. D. Luis Capitán Morales, creador del proyecto. Su constante ánimo, apoyo y esfuerzo, su disponibilidad total, sobre todo en estos últimos meses, para que este trabajo se viera concluido, no ha tenido límites. Gracias

A mis compañeros y amigos, que me han animado y ayudado de forma constante. Al Dr. Galán, por muchas cosas y porque en todas las guardias me preguntaba por mi Tesis. A Charo que me ha acompañado en el camino. A Jose y Reme, compañeros siempre alerta, que de forma tan generosa han sacrificado su tiempo por el mío.

Al Dr. Fernando Oliva, por estar ahí, desde casi el inicio de mis días como facultativo especialista. Gracias.

Al Dr. Angel Nogales, por darme el tiempo que necesité, y su alegría sincera al ver terminar el proyecto.

A todos aquellos que han participado en el trabajo de este estudio: al Dr. Francisco Moreno Torres en especial, por su tremenda generosidad, Dra. Inmaculada Sánchez- Matamoros Martín, DUE D<sup>a</sup> Dolores Sánchez-Matamoros Martín, Dr. D. Francisco Rivera y Dr. D. Juan Polo.

Un agradecimiento especial a mis padres, ellos lo dieron todo por nosotros, comprendiendo que mi tiempo había de ser dedicado a este trabajo en momentos delicados. A mis hermanos que me han dado mucho, entre otras cosas, preciosos sobrinos.

A mis amigos fuera del ámbito hospitalario, por seguir queriéndome aún no dedicándoles mucho tiempo. A Ana en especial, que siempre está ahí.

Por último, a mi marido, Jose. Sin él, este proyecto no hubiera sido posible, desde su mismo inicio, siempre por estar a mi lado, apoyándome y obligándome cuando ha sido necesario. Gracias.

A mi Ale, por el tiempo que le he robado.



# INDICE

---

NOTACIÓN .....	11
INDICE DE TABLAS. ....	12
INDICE DE GRÁFICOS. ....	13
INTRODUCCIÓN. ....	14
1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL CANCER DE COLON.....	14
1.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	14
1.2. GENÉTICA .....	18
1.3. FACTORES DE RIESGO. ....	24
2. SCREENING DE CARCINOMA COLORRECTAL.....	33
3. CLASIFICACIÓN POR ESTADIO Y PRONÓSTICO. ....	35
4. TRATAMIENTO DEL CANCER COLORRECTAL. ....	38
5. PREVENCIÓN DEL CANCER COLORRECTAL. ....	46
JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS. ....	50
OBJETIVOS DEL ESTUDIO. ....	52
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
1. MATERIAL. ....	53
1.1. LABORATORIO. ....	53
1.2. ANIMALES.....	55
1.3. AZOXIMETANO .....	57
1.4. ROFECOXIB .....	58
1.5. MATERIAL ANESTÉSICO Y QUIRÚRGICO.....	59
2. MÉTODOS. ....	60
2.1 DURACIÓN DEL ESTUDIO.....	60
2.2 PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS.....	63
2.2.1 PESO DE ANIMALES Y CONSUMO DE AGUA.....	63

2.2.2	ADMINISTRACIÓN DE ROFECOXIB.....	65
2.2.3	ADMINISTRACIÓN DE AZOXIMETANO.....	69
2.3	MÉTODOS ANESTÉSICOS.....	71
2.4	MÉTODOS QUIRÚRGICOS.....	72
2.5	MÉTODOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	73
2.6	MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	76
3.	RESULTADOS.....	77
3.1.	RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	77
3.2.	RESULTADOS ESTADÍSTICOS.....	102
3.2.1.	MORTALIDAD.....	102
3.2.2.	NÚMERO Y TAMAÑO DE PÓLIPOS.....	108
3.2.3.	NÚMERO Y TAMAÑO DE TUMORES.....	109
3.2.4.	GRADOS DE DUKES EN LOS TUMORES.....	110
3.2.5.	PRESENCIA DE METÁSTASIS.....	110
4.	DISCUSIÓN.....	111
5.	CONCLUSIONES.....	117
6.	REFERENCIAS.....	119

# NOTACIÓN

---

CCR	Carcinoma Colorrectal.
CIN	Inestabilidad cromosómica.
MSI	Inestabilidad de microsatélites.
PAF	Poliposis adenomatosa familiar.
HNPCC	Carcinoma Colorrectal Hereditario no polipósico.
TSHO	Test de sangre oculta en heces.
ETM	Escisión total del Mesorrecto.
ERES	Enhanced recovery after surgery o Rehabilitación multimodal.
CEA	Antígeno Carcinoembrionario.
AINES	Antinflamatorios no esteroideos.
QT	Quimioterapia.
RT	Radioterapia.

# INDICE DE TABLAS

---

Tabla 1	Riesgo Familiar de Carcinoma Colorrectal.
Tabla 2	Criterios de Amsterdam y Bethesda .
Tabla 3	Clasificación TNM de CCR y Pronóstico.
Tabla 4	Distribución de animales en las jaulas.
Tabla 5	Tiempos en el estudio.
Tabla 6	Peso medio de las ratas.
Tabla 7	Consumo medio de agua por semanas.
Tabla 8	Dosis de Rofecoxib en la semana 1.
Tabla 9	Dosis de Rofecoxib desde la estabilización del peso.
Tabla 10	Primera dosis de Azoximetano en la semana 3.
Tabla 11	Segunda dosis de Azoximetano en la semana 9.
Tabla 12	Tercera dosis de Azoximetano en la semana 10
Tabla 13	Muestras obtenidas tras finalizar el estudio.
Tabla 14	Porcentaje de Grados de Dukes por grupo y sexo.
Tabla 15	Registro de tumores observados por grupo.
Tabla 16	Lesiones extracolónicas observadas.
Tabla 17	Registro de pólipos observados por grupo.
Tabla 18	Número de muertes por semana en el grupo 1.
Tabla 19	Número de muertes por semana en grupo 2.
Tabla 20	Número de muertes por semana en grupo 3.
Tabla 21	Mortalidad del estudio.

# INDICE DE GRÁFICOS

---

- Gráfico 1    Número de tumores por Estadíos de Dukes en los tres grupos.
- Gráfico 2    Número de tumores por grupo.
- Gráfico 3    Tamaño de tumores por grupos.
- Gráfico 4    Número de pólipos según el grupo.
- Gráfico 5    Tamaño de pólipos pos grupo.
- Gráfico 6    Mortalidad por grupos y sexos.
- Gráfico 7    Mortalidad por sexos.

# INTRODUCCIÓN.

---

## **1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL CANCER DE COLON.**

### **1.1. EPIDEMIOLOGÍA.**

El cáncer Colorrectal (CCR) es uno de los mayores problemas de salud en el mundo, siendo el tercer cáncer más frecuente diagnosticado en hombres y el segundo en mujeres, y afectando cada año, a casi 1.400.000 nuevos pacientes, y ocasionando el fallecimiento estimado de unos 694.000 pacientes en 2012. Es la tercera causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres.

La incidencia es mayor en América del Norte, Australia y Nueva Zelanda, así como en algunos países europeos, mientras que las tasas más bajas se encuentran en África y Asia sur-central. La posibilidad de desarrollar CCR en los países desarrollados, es de 4.4 % en hombres y 2.7 % en mujeres, con una mortalidad similar en los dos sexos <sup>(1)</sup>.

La tasa de incidencia de CCR está en alza en la mayoría de los países y aumentando rápidamente en áreas tradicionalmente de bajo riesgo, entre ellos España, y una serie de países del este de Asia y Europa. En concreto, la incidencia entre los hombres de República Checa y Japón ha superado el pico de incidencia de Estados Unidos, Canadá y Australia,

donde sin embargo la incidencia parece estar disminuyendo o estabilizándose. No ocurre así con el cáncer rectal, que ha permanecido relativamente estable.

Se considera que estas tendencias están en relación con una combinación de factores que incluyen cambios alimentarios, obesidad y prevalencia del hábito tabáquico.

Los Estados Unidos es el único país con una disminución significativa de incidencia de CCR en hombres y mujeres en el período más reciente, con una disminución del 2-3% anual en los últimos 15 años, lo que refleja en gran medida la detección y eliminación de las lesiones precancerosas como consecuencia de adecuados programas de screening. De igual forma, ha disminuido la tasa de mortalidad, que se puede atribuir, al menos en parte, a la detección y eliminación de los pólipos de colon, la detección de CRC en una etapa anterior, y los tratamientos primarios y adyuvantes más eficaces.

Sin embargo, al menos en los Estados Unidos, la disminución de la mortalidad por cáncer colorrectal se inició mucho antes de la aplicación generalizada de cribado de CCR y antes de la terapia adyuvante eficaz. (2)

Si bien las tasas de mortalidad por CCR han disminuido en varios países occidentales, en gran parte como resultado de un mejor tratamiento y una detección más temprana, las tasas siguen aumentando en muchos países con recursos más limitados y peor infraestructura de salud, particularmente en Centro y Sur América y Europa Oriental.

Los factores de riesgo modificables para el cáncer colorrectal incluyen el tabaquismo, la inactividad física, el sobrepeso y la obesidad, el

consumo de carne roja y procesada, y el consumo en exceso de alcohol. Los programas de cribado se realizan con éxito en países occidentales, pero en los que tienen peor nivel económico y culturalmente se están occidentalizando, deberían ser implementados para mejorar estos datos.

Se ha demostrado en un estudio aleatorizado reciente en el Reino Unido, que una sigmoidoscopia una sola vez entre los 55 y 64 años de edad reduce la incidencia del cáncer colorrectal en un 33% y la mortalidad en un 43% .

También se ha apreciado un cambio en la tendencia de localización de los tumores colorrectales, apareciendo gradualmente un mayor número de neoplasias localizadas en el lado derecho, tanto en EEUU como en el resto de países, con mayor aumento relativo en la incidencia de las neoplasias cecales.

Este cambio en la distribución anatómica de CCR puede estar, en parte, en relación a las mejoras en el diagnóstico y el tratamiento, y el aumento de la detección con la extirpación de pólipos adenomatosos en el colon distal. La colonoscopia es más eficaz en la prevención del lado izquierdo que en el lado derecho, lo que también podrían contribuir a un cambio en la distribución de los tipos de cáncer en el colon.

Es probable que parte de la diferencia se deba a aspectos relacionados con la calidad de la colonoscopia (pobres preparaciones del lado derecho, colonoscopia incompleta, configuraciones anatómicas que impiden adecuada visibilidad), pero la biología tumoral también difiere entre los tumores de colon derecho e izquierdo. Por ejemplo, los adenomas serrados, que son más planos y difíciles de visualizar endoscópicamente y que, característicamente llevan mutaciones genéticas que dan lugar a



microsatélites inestables, son más comunes en el colon derecho. Aunque todas estas cuestiones pueden contribuir a un cambio de tendencia en la incidencia hacia la derecha en lugar de cánceres del lado izquierdo, también parece existir un verdadero aumento de la incidencia de los cánceres de colon ascendente y ciego <sup>(3,4)</sup>.

Los estudios realizados en diferentes etnias y razas, así como en inmigrantes, sugieren que los factores ambientales juegan un importante papel en el desarrollo de esta enfermedad. Aunque existe evidencia de una predisposición genética a su desarrollo, la mayor diferencia se atribuye a las diferencias en hábitos dietéticos y otros factores medioambientales.

La incidencia de cáncer de colon y de recto es independiente de la distribución geográfica. En población de riesgo, la tasa es mayor ó igual a 2:1, y es similar en la población considerada de menor riesgo. En cada país, la incidencia también varía entre centros urbanos y rurales, siendo mayor en las regiones urbanas <sup>(5,6)</sup>.

## **1.2. GENÉTICA.**

En la última década, se han descubierto múltiples mutaciones genéticas que son factores fundamentales en la tumorigénesis colorrectal, en la denominada secuencia adenoma-adenocarcinoma, propuesta por Hill y colaboradores en 1978. <sup>(7)</sup>

Esta teoría ha sido aceptada de forma general, al comprobarse que ocurre de manera similar en las formas esporádicas y en las familiares de CCR.

Para entender esta secuencia, debemos conocer la histología del colon. El colon está revestido por una capa única de células epiteliales columnares, que se organizan en invaginaciones llamadas criptas. Cada cripta se divide en dos zonas funcionalmente distintas: una proliferativa, de células en la porción inferior de las criptas y una que comprende células en la parte superior de las criptas, de células diferenciadas.

En la parte inferior, existen células madre capaces de dividirse y diferenciarse, dando lugar a las cuatro líneas celulares que coexisten en estas criptas: células de absorción, células de Paneth, células caliciformes y células enteroendocrinas. Las células madre producen células indiferenciadas que se dividen varias veces y migran hasta las criptas, donde dejan de diferenciarse convirtiéndose en enterocitos maduros, responsables de la absorción, células caliciformes y células enteroendocrinas.

Las células de Paneth, por el contrario, migran a la región inferior de las criptas, y tienen la función de secretar enzimas proteolíticos que participan en la digestión y defensa del epitelio.

Todas estas células son clones, ya que derivan todas de una misma célula madre.

Estas células se someten a la muerte celular programada o apoptosis en la parte superior de las criptas. La vida de estas células es de 4 ó 5 días (las células de Paneth viven 4 semanas). Este rápido recambio celular se cree que es un mecanismo de protección frente a los carcinógenos intestinales.

Debido a un crecimiento reactivo de estas células, aparecen pólipos intestinales, que son crecimientos de parte del intestino hacia la luz de este y por definición, visibles a simple vista.

Hay cambios específicos o mutaciones en los cromosomas de estas células y cambios genéticos, que ocurren durante la transición desde la mucosa colónica normal al carcinoma invasivo<sup>(8,9)</sup>.

El estudio de Vogelstein et al, fue el precursor para el conocimiento de la tumorigénesis de CCR, y la base para la caracterización de las principales vías moleculares <sup>(10)</sup>. El desarrollo del CCR requiere de la adquisición de múltiples mutaciones de los genes causantes del cáncer. Los genes más comúnmente mutados controlan las actividades y comportamientos celulares clave, como proliferación, migración y supervivencia.

Estas alteraciones genéticas que conducen desde el epitelio colorrectal normal al adenocarcinoma se produce a través de dos vías:

- Inestabilidad cromosómica (CIN)
- Inestabilidad de microsatélites (MSI)

En la vía CIN, se producen mutaciones en los genes supresores de tumores, tales como APC (gen de la poliposis colónica), p53 y DCC (delete in colon cáncer), y también en protooncogenes como KRAS. Estas mutaciones se manifiestan por grandes deleciones de regiones de los cromosomas que contienen el gen supresor de los tumores. En la mayoría

de los CCR, incluyendo los que se producen en el contexto de la Poliposis Adenomatosa familiar (PAF), surgen a través de la vía CIN, con mutación precoz de APC (hasta el 80%), por lo que se le ha dado en llamar “el guardián” de la esta vía.

La vía MSI es el resultado de errores de replicación en nucleótidos de ADN conocidos como microsatélites y que están dispersos por todo el genoma, y del fallo en la corrección de este tipo de errores como consecuencia de la mutación de los genes de reparación (MMR). Entre ellos, estarían hMLN1, hMLN2, hPMS1 y hPSM2. Estos genes ocasionarían posteriores mutaciones en otros como TGFβIIr (receptor de TGF-β II), IGFR2 (factor de crecimiento del receptor-2 similares a la insulina), genes de reparación de falta de coincidencia, y BAX, e incluso el ADN, hMSH3 y hMSH6.

Un 15% de los CCR esporádicos surgen a través de esta vía, así como el CCR hereditario no polipósico (HNPCC).

Los mecanismos epigenéticos capaces de alterar la expresión de estos genes en ausencia de mutaciones, aún están en discusión.<sup>(11)</sup>

Como ya se ha dicho, los cambios más comunes son mutaciones puntuales del protooncogen K-ras, y mutaciones en los tres genes supresores del crecimiento, p53, el gen de la Poliposis adenomatosa Colónica (APC) y el DCC (delete in colon cancer). Los dos alelos de los tres genes supresores del tumor deben estar ausentes o defectuosos para que exista la expresión fenotípica. Sin embargo, en el caso del K-ras, la mutación puede existir sólo en unos de los alelos, para que se exprese fenotípicamente el tumor. <sup>(12)</sup>

El gen p53 está localizado en el cromosoma 17p. Parece estar involucrado en la transformación maligna, durante la conversión de

adenoma a adenocarcinoma. La pérdida del gen p53 es infrecuente en adenomas pero aparece en más del 75% de adenocarcinomas. Su mutación tiene otros efectos, incluyendo la menor capacidad para detectar el ADN dañado, inestabilidad del cariotipo, alteración de la fase G1 del ciclo celular y disminución de la apoptosis. (13,14)

El APC gen se encuentra en el locus 5q21-q22, y se piensa que está involucrado en el inicio de la formación del adenoma, y la pérdida de la heterocigosis del gen APC, está asociado a la progresión a Carcinoma. Este se encuentra mutado hasta en el 80% de los pólipos esporádicos y los adenocarcinomas. La mutación aparece incluso de forma precoz en los adenomas, y permanece constante a través de la transformación neoplásica. Es la mutación más frecuente en el CCR.

La línea germinal de mutación del gen APC es también responsable de la formación de múltiples adenomas en la Poliposis adenomatosa familiar (PAF). La proteína APC podría estar involucrada en una serie de interacciones entre proteínas implicadas en la señalización celular, apoptosis y adhesión celular. (15,16,17,18,19)

Otros estudios de la función del gen APC revelaron que su principal función era causar la degradación de una proteína citoplasmática, la  $\beta$ -catenina. Esta proteína se encuentra en las uniones intercelulares de las células intestinales epiteliales, y tiene una vida corta en el citoplasma porque sufre una rápida degradación.

La pérdida de la función del gen APC, conduce a una acumulación citoplásmica de  $\beta$ -catenina y aumento de traslocación de  $\beta$ -catenina en el núcleo, lo que ocasiona una inhibición de la apoptosis y la estimulación de proliferación celular.(20,21)

El gen DCC (cromosoma 18q) interviene en la adhesión neural de la molécula, y participa en la progresión, invasión y metástasis. La pérdida de un alelo se ha apreciado en el 50% de los adenomas y en más de 70% de los adenocarcinomas. (22,23,24)

El K-ras es un oncogen implicado en promover la tumorigénesis al causar la hiperproliferación de células colorrectales, tanto en el estadio temprano del adenoma como posteriormente en su transformación maligna. La expresión del protooncogen es menor en pequeños adenomas, comenzando a hacerse más pronunciado (aproximadamente el 50%), en adenomas mayores de 1 cm. y en adenocarcinomas. El papel de la mutación del K-ras no está del todo aclarado, ya que la mutación también se ha encontrado en epitelio colónico normal y criptas aberrantes focales.(9)

Las mutaciones en los genes de reparación de DNA dañado, ocurren en los Cánceres de colon Hereditarios no polipoideos (HNPCC), y al menos son cinco los genes implicados: *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS1* y *hPSM2*. Estas proteínas reconocen y corrigen las anomalías que se producen en la replicación y recombinación, e incluso previenen la mutación resultante de estos errores. La inestabilidad de los microsatélites ocurre en el 15% de los tumores CCR. (25,26,27)

La Ciclooxygenasa COX-2 es una proteína que con frecuencia está sobreexpresada en estos cánceres(28) y parece desarrollar un importante papel en su génesis, y ya que esta sobreexpresión no se debe a una mutación en el gen COX-2, se trata por separado de los otros genes implicados.

La Ciclooxygenasa-2 ha sido motivo de estudio, al comprobarse en algunos trabajos, que la aspirina, otros AINES y el Ibuprofeno, reducían la mortalidad en pacientes con CCR, llevando a sus células a la apoptosis.

También se apreció que existe una sobreexpresión de esta enzima en aproximadamente el 85% de los cánceres y en más del 40% de los adenomas. (29,30,31)

En base a esto, se han realizado estudios con inhibidores específicos de la COX-2, que parecen disminuir el número de neoplasias en animales de experimentación tratados con carcinógenos.(32,33) Las dosis necesarias para inhibir la tumorigénesis son considerablemente más altas que la inhibición plasmática de la COX-2 con efecto antiinflamatorio.

En 1999, la FDA aprobó el uso de Celecoxib, otro inhibidor de la COX-2, en pacientes con PAF a los que se había realizado Colectomía subtotal, como quimioprevención (34). Este fue retirado en 2004 ante la evidencia de efectos indeseables cardiovasculares, ya que no tienen efecto sobre la antiagregación plaquetaria como ocurre con otros AINES.

Pero también se ha demostrado que existen otros mecanismos implicados en la producción del cáncer de colon, entre ellos la participación y modulación del óxido nítrico.

### **1.3.- FACTORES DE RIESGO.**

Muchos son los Factores de riesgo que se han identificado para el CCR, y que igualmente han sido objeto de estudio en múltiples ensayos y estudios poblacionales.

Quizás uno en los que más se han fijado los científicos ha sido la **Dieta**. La variabilidad internacional en la incidencia del CCR puede ser resultado de la predisposición genética, pero también a los diferentes hábitos dietéticos. Existe una convincente evidencia de que las dietas ricas en carne roja aumentan el riesgo de CCR, sobre todo en colon izquierdo. Por ejemplo, la correlación entre la ingesta de carne roja y la incidencia de cáncer de colon es 0,85 para los hombres y 0,89 para las mujeres <sup>(35)</sup>.

También parecen estar implicada la cocción a alta temperatura de la carne (barbacoas) a través de la producción de hidrocarburos poliaromáticos y otros carcinógenos, producidos a partir de las proteínas en la carbonización<sup>(36)</sup>.

Este exceso de riesgo por el consumo de carne roja puede ser contrarrestado por el aporte de Vitamina B12 y hierro.

La dieta rica en fibra se postuló por la baja incidencia de CCR en Africa, como protectora, por la dilución de los carcinógenos fecales, reducir el tiempo de tránsito colónico, alteración el metabolismo del ácido biliar, reduciendo el pH del colon, o aumentando la producción de ácidos grasos de cadena corta. Sin embargo, en grandes estudios prospectivos la asociación inversa entre la ingesta de fibra y riesgo de cáncer de colon ha sido débil o inexistente<sup>(37,38,39,40)</sup>.



Lo mismo, se ha postulado con la dieta rica en frutas y verduras, por contener anticancerígenos como antioxidantes (carotenoides y vitamina C), folatos, flavonoides e inhibidores de las proteasas que pueden influir en las alteraciones del ADN y por tanto, reducir mutaciones. En muchos estudios epidemiológicos se concluye que existen pruebas sólidas que demuestran el beneficio de su ingesta (41,42).

La historia familiar y los **Antecedentes familiares** si son un importante factor de riesgo para CCR. Parece que los sujetos con un familiar de primer grado que padece la enfermedad, tiene de dos a tres veces mayor riesgo que la población de padecer CCR esporádico. Y el riesgo aumenta si existen más familiares afectados(43,44). (Tabla 1).

Historia familiar	Riesgo acumulado de CCR
Riesgo en población general	6%
Un familiar de primer grado con CCR	2-3 veces (más frecuente respecto a población general)
Dos familiares de primer grado con CCR	3-4 veces (incremento respecto al riesgo de la población general)
Un familiar de primer grado con CCR diagnosticado antes de los 50 años	3-4 veces
Un familiar de segundo o tercer grado con CCR	1,5 veces
Dos familiares de segundo grado con CCR	2-3 veces
Un familiar de primer grado con adenoma colorrectal	2 veces

Tabla 1 - *Riesgo familiar de CCR.*

Familiares de primer grado: padres, hermanos e hijos.

Familiares de segundo grado: abuelos, tíos y sobrinos.

Familiares de tercer grado: bisabuelos y primos.

Hay varios Síndromes que, por su agregación familiar y seguimientos genéticos, se han comprobado que tienen una mayor incidencia de CCR que en la población general.

La Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF), es un síndrome que se hereda de forma autosómica dominante. Se debe a mutaciones germinales en los genes de supresión tumoral (APC en la Poliposis adenomatosa familiar, MYH en la Poliposis asociada a este gen, y SKT II en Síndrome de Peutz-Jeghers).

Predispone al desarrollo de CCR, ya que los pólipos aparecen en edades tempranas, y si no se realiza Colectomía profiláctica, aparecerá en un 75% de los casos alrededor de los 35 años y con más predominancia en colon izquierdo. Constituye el 1% de los CCR.

Los Síndromes de CCR Hereditario no Polipósico (HNPCC) son dos principalmente: el Síndrome de Lynch y el Síndrome CCR Familiar tipo X (45,46).

El Síndrome de Lynch, autosómico dominante, se debe a mutaciones germinales en genes de reparación de ADN: MSH2(en el 38% de los casos) , MLH1 (en 59%), y MSH6 y PMS2 (en menor porcentaje ).

También existe un aumento de la incidencia de CCR, cumpliendo los Criterios de Bethesda y Amsterdam. (Tabla 2). Constituye el 5% de todos los CCR.

Se caracteriza por una aparición en edades más tempranas, de predominio derecho en la localización y por su desarrollo sincrónico y metacrónico, así como por la presentación de otros tumores extra-colónicos(47).

En el Síndrome CCR Familiar tipo X, aunque cumplen los Criterios de Amsterdam, no hay evidencia de alteraciones del sistema de reparación

de ADN. Tiene menor riesgo de CCR y neoplasias extracolónicas que el Síndrome de Lynch (48).

Otro factor de riesgo de importancia es la afección por **Enfermedad Inflamatoria Intestinal**.

La Colitis Ulcerosa se asocia a un riesgo mayor de CCR, comenzando a aparecer un aumento del a los 5 -8 años de inicio de la enfermedad, y con un Riesgo absoluto del 30% después de los 35 años(49). El riesgo también aumenta si se trata de una Pancolitis, más que en la localización izquierda.

Hay mayor proporción de CCR en colon derecho y transversal en C.U. que sin colitis(49). La incidencia es similar en ambos sexos.

Otros factores de riesgo adicionales son la presencia de Colangitis Esclerosante Primaria, la Severidad de la C.U. y el número de episodios agudos, efecto de la medicación en la Enfermedad y déficit de folatos.

(50,51,52)

A menudo las lesiones son agresivas y pobremente diferenciadas en el momento del diagnóstico.

La mutación del gen APC ocurre con menor frecuencia en estos pacientes que en los CCR esporádicos, por lo que no debe estar implicado en el inicio de la malignización.

Pacientes con Pancolitis de más de 8 años de evolución deberían incluirse en programas de Colonoscopias periódicas y Colectomías profilácticas.

Está menos claro si existe un mayor riesgo de desarrollo de CCR en pacientes con Enfermedad de Crohn, aunque parece existir una mayor incidencia que en la población general (53,54).

Existen determinadas **Profesiones**, en las que está aumentado el riesgo de CCR, entre ellas:

- **Trabajadores de Asbesto** –es el tercer cáncer más común entre estos profesionales, después del cáncer de pulmón y el mesotelioma. Hay un aumento del riesgo relativo entre el 1.4 y 3%, y parece que es secundario a la exposición de la mucosa colónica al asbesto que contienen los esputos de estos pacientes <sup>(54)</sup> y con una relación temporal de más de 20 años.
- **Trabajadores de Acrylonitrilo**, que es un monómero gaseoso usado en la síntesis de plásticos, caucho sintético y polímeros de fibra. Presentan un incremento en la mortalidad, ya que todos los pacientes que trabajaron más de 6 meses, presentaron CCR con una latencia de 10 a 30 años.
- **Los pintores, barnizadores y trabajadores de la madera**, tienen mayor riesgo de neoplasia CCR que ninguna otra profesión estudiada <sup>(55)</sup>.
- Otros: trabajadores de Acrilato de etilo, Metil-metacrilato y Dibromocloropropano.

El **Hábito tabáquico** ha sido asociado con una mayor incidencia y mortalidad de CCR. Se estima que el riesgo de desarrollar CCR fue mayor entre los fumadores de cigarrillos en comparación con aquellos que nunca

habían fumado, incrementándose también el riesgo de muerte por CCR. Tanto en la incidencia como en la mortalidad, la asociación fue más fuerte para el cáncer del recto.

Fumar cigarrillos es también un factor de riesgo para todos los tipos de pólipos de colon. Para los pólipos adenomatosos, el riesgo es especialmente alto para los adenomas avanzados (es decir, los más grandes y con características displásicas) (57,58).

La asociación entre el **consumo de Alcohol** y el riesgo de CCR, se ha demostrado en algunos estudios y pudiera estar relacionado con la interferencia de la absorción de folato por el alcohol y la disminución de la ingesta de folato (59,60,61).

Dos importantes estudios de cohortes, han demostrado que la **Obesidad** aumenta el riesgo de padecer cáncer de colon y recto en 1.5% (61) y que por cada aumento de 5 Kg/m<sup>2</sup> de masa corporal aumenta un 24% el riesgo en hombres, y un 9% en mujeres (62,63). Además, la obesidad aumenta el riesgo de morir por CCR.

La actividad física esta inversamente relacionada con el riesgo de carcinoma de colon.

Los **Factores hormonales** también han sido implicados en este proceso. Los estudios que trataban de demostrar el posible efecto protector de la **terapia de sustitución hormonal** durante la menopausia han sido contradictorios. En uno de ellos parece que existe una pequeña reducción del riesgo de cáncer de colon en aquellas mujeres que mantuvieron esta terapia sustitutiva durante 5 años o más (64).

Una menor incidencia de adenomas parece estar relacionado con mujeres que tuvieron la menarquía antes de los 13 años. Es necesario realizar estudios prospectivos en los que se determine si realmente existe un efecto protector de la terapia sustitutiva, el grado de este efecto, así como su mecanismo.

En la **Acromegalia** los pacientes son más susceptibles de tener pólipos y sobre todo localizados proximal a la flexura esplénica, con lo que son menos fácilmente accesibles al rectosigmoidoscopio, y por tanto más difíciles de localizar y extirpar precozmente (65).

El **Transplante de órganos**, en relación con la prolongada inmunosupresión a la que son sometidos estos pacientes, también constituye un factor de riesgo, de tal forma que en algunos centros se protocoliza screening con colonoscopia a partir de los 40 años o tras 5 años del transplante (66).

La evidencia sugiere que la **Diabetes Mellitus** se asocia con un riesgo elevado de CCR (67,68,69).

Un meta-análisis de 14 estudios estima que el riesgo de cáncer de colon entre los diabéticos fue de aproximadamente 38 % mayor que en los no diabéticos, y para el cáncer rectal, fue 20 % mayor (70).

Una posible explicación de la vinculación de la diabetes con el CCR, es la hiperinsulinemia, ya que la insulina es un factor importante de crecimiento para células de la mucosa del colon y estimula las células tumorales en el colon.

Existe una relación similar entre los niveles séricos de péptido C (un indicador de la producción de insulina) y el riesgo de CCR. La terapia de insulina crónica también puede estar asociada con un mayor riesgo de CCR en los diabéticos, aunque los datos son contradictorios (71,72,73).

Además de aumentar el riesgo de la enfermedad, la diabetes también puede influir en el pronóstico de los pacientes con CRC. Los individuos con diabetes mellitus tipo 2 tenían un riesgo significativamente mayor de mortalidad específica por cáncer en relación con los que no tienen diabetes (74). La asociación no se relacionó con los niveles de insulina, así como el tratamiento con la insulina no influyó en la mortalidad por CCR.

La **Terapia antiandrogénica** a largo plazo, parece tener relación con el aumento de riesgo de CCR.

Los pacientes que recibieron hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) ó sufrieron una orquiectomía, tuvieron mayor riesgo de desarrollar CCR, con un aumento directamente proporcional cuanto mayor es el tiempo de tratamiento (75,76).

El mecanismo implicado no está claro, aunque parece que podría estar relacionado con la resistencia insulínica que se produce con la terapia antiandrogénica (77).

En algunos estudios se ha indicado que existe un riesgo discretamente mayor en pacientes a los que se ha practicado una **Colecistectomía**, de padecer cáncer de colon derecho, pero no de colon izquierdo, que parece relacionado con alteraciones de la composición de ácidos biliares en el colon después de la colecistectomía(78).

La **Enfermedad coronaria cardiaca** se ha relacionado con una mayor incidencia de adenomas y de CCR avanzado, aunque no están claros los mecanismos implicados, podrían estar relacionados con otros factores de riesgo comunes<sup>(79)</sup>.

Numerosas **Infecciones** han sido estudiadas en su posible relación con CCR, proponiéndose varios agentes bacterianos y virales como factores de riesgo para CCR. Los datos sobre H. pylori, Virus JC y Virus papiloma humano, no han sido concluyentes<sup>(80)</sup>.

Se ha analizado la asociación entre la infección por Streptococcus bovis, particularmente el subtipo gallolyticus y la neoplasia de colon, pero se cree que se trata más bien de una consecuencia que un factor de riesgo<sup>(81)</sup>.

Parece que existe también un aumento significativo de cáncer de colon en pacientes con VIH<sup>(82,83)</sup>.



## **2. SCREENING DE CCR.**

El tiempo de progresión de adenoma a carcinoma, no está bien definido. Sin embargo, a través de una evidencia indirecta, parece ser un proceso relativamente lento, a lo largo de años, de al menos 10 a 15 años. La probabilidad de transformación carcinomatosa aumenta en relación con el tamaño de la lesión, a la proporción del componente vellosos y al grado de displasia.

En el Síndrome de Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (HNPCC) parece que la progresión puede ser algo más corta.

Esto motiva, que sea aconsejable la realización de test de sangre oculta en heces (TSHO) y Colonoscopia a los 50 años en la población general a modo de screening, y a partir de ahí cada 5 años<sup>(84,85)</sup>.

Para el Diagnóstico de CCR, de igual forma, se debe realizar una Colonoscopia Diagnóstica en aquellos sujetos en los que aparezca alteración del hábito intestinal de más 6 semanas, siendo mayores de 40 años y asociado o no a rectorragia, anemia o TSHO positivo <sup>(86)</sup>.

De igual forma, en los pacientes con familiares de primer grado afectados de CCR, se aconseja el screening con Colonoscopia a partir de los 40 años y cada 5 años (o 10 años antes del diagnóstico del familiar más joven).

En aquellos pacientes con CCR Hereditario no asociado a poliposis (HNPCC), el seguimiento se debe realizar mediante Colonoscopia anual o bianual desde los 20-25 años, ó diez años antes del diagnóstico del familiar más joven.

Los familiares con CCR Hereditario X, cumplen los Criterios de Amsterdam (Tabla 2), pero no hay evidencias de alteraciones en el sistema reparador de ADN, tienen menos riesgo de padecer CCR o extracolónicos que los afectados por Síndrome de Lynch. El cribado se aconseja que sea realizado cada 3 años, desde los 35 años o diez años antes del diagnóstico del familiar más joven<sup>(87,88,89,90)</sup>.

<p><b>Criterios de Ámsterdam II:</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Tres o más individuos afectados de CCR o neoplasia relacionada (endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal), uno de ellos familiar de primer grado de los otros dos, y</li> <li>– Afectación de 2 generaciones consecutivas, y</li> <li>– Como mínimo un caso diagnosticado antes de los 50 años, y</li> <li>– Exclusión del diagnóstico de poliposis adenomatosa familiar</li> </ul>
<p><b>Criterios de Bethesda revisados:</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– CCR diagnosticado antes de los 50 años</li> <li>– Presencia de CCR sincrónico o metacrónico u otra neoplasia relacionada (endometrio, estómago, ovario, páncreas, urinario, cerebro, intestino delgado), con independencia de la edad</li> <li>– CCR con infiltración linfocitaria, células en anillo de sello o crecimiento medular diagnosticado antes de los 60 años</li> <li>– Paciente con CCR y uno o más familiares de 1º grado con CCR o neoplasia relacionada (endometrio, estómago, ovario, páncreas, urinario, cerebro, intestino delgado) diagnosticada antes de los 50 años</li> <li>– Paciente con CCR y dos o más familiares de 1º o 2º grado con CCR o neoplasia relacionada (endometrio, estómago, ovario, páncreas, urinario, cerebro, intestino delgado), con independencia de la edad</li> </ul>

Tabla 2. Criterios de Amsterdam y Bethesda

### **3. CLASIFICACIÓN POR ESTADIOS Y PRONÓSTICO.**

El estadiaje definitivo del CCR se realiza según los hallazgos operatorios y el estudio anatomopatológico de la pieza de resección.

El pronóstico de los pacientes con CCR se correlaciona con el estadio evolutivo del tumor y la forma de presentación del mismo.

Otros factores adicionales que se han descrito asociados a un peor pronóstico son:

- Edad - diagnóstico antes de los 40 años o después de los 70 años.
- Forma clínica de presentación, como perforación u obstrucción intestinal.
- Tamaño del tumor.
- Grado de diferenciación tumoral.
- Invasión vascular, linfática o perineural.
- Elevación de la concentración sérica de CEA (antígeno carcinoembrionario) basal.
- Aneuploidía, sobreexpresión de p53 y ausencia de inestabilidad de microsatélites.

El estadio se establece según el sistema TNM (Tabla 3), definido por el Comité Conjunto Estadounidense del cáncer (AJCC).

<b>Clasificación y Pronóstico CCR.</b>		
<b>Clasificación TNM</b>		
– Tumor primario		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tis Intraepitelial o invasión de la lámina propia (intramucoso)</li> <li>• T1 Invasión de la submucosa</li> <li>• T2 Invasión de la muscular propia, sin sobrepasarla</li> <li>• T3 Invasión de la serosa o grasa pericólica</li> <li>• T4 Invasión de órganos adyacentes y/o cavidad peritoneal               <ul style="list-style-type: none"> <li>T4a – perforación peritoneo visceral.</li> <li>T4b – afecta peritoneo parietal.</li> </ul> </li> </ul>		
– Afectación ganglionar		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- N0 Ausencia</li> <li>- N1 Afectación de 1-3 ganglios</li> <li>- N2 Afectación de 4 o más ganglios</li> </ul>		
– Metástasis a distancia		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- M0 Ausencia</li> <li>- M1 Presencia               <ul style="list-style-type: none"> <li>M1a – metástasis en un solo órgano</li> </ul> </li> </ul>		
<b>ESTADIOS</b>	<b>TNM</b>	<b>Supervivencia a 5 años</b>
<b>Estadio 0</b>	Tis N0 M0  Tis=carcinoma in situ	95-100%
<b>Estadio I</b>	T1-2 N0 M0	80-90%
<b>Estadio II</b>	T3-4 N0 M0	50-75%
<b>Estadio III</b>	T1-4 N1-2 M0	25-45%
<b>Estadio IV</b>	T1-4 N0-2 M1	< 5%

Tabla 3 – *Estadaje TNM y Pronóstico de CCR.*

Cuando la evaluación preoperatoria detecta la presencia de metástasis a distancia, la estadificación queda establecida antes de la intervención quirúrgica.

Igualmente en los pacientes con cáncer de recto sometidos a tratamiento neoadyuvante, en los que la radioterapia y/o la quimioterapia pueden comportar una infraestadificación de la lesión, prevalece el estadio establecido en la evaluación previa al tratamiento.

#### **4.- TRATAMIENTO DE CCR.**

El único tratamiento con capacidad curativa en el CCR es la **Cirugía**, teniendo en cuenta algunas directrices que han sido ampliamente estudiadas<sup>(90,91)</sup>.

La resección del tumor debe hacerse con adecuados márgenes, más de 5 cm y con linfadenectomía que incluya más de 12 ganglios, que permita un estudio anatomopatológico completo y adecuado.

Ante un tumor con invasión de los órganos adyacentes (T4) deberá realizarse una resección en bloque para obtener una resección macroscópica completa (R0).

La técnica quirúrgica, dependerá de la localización del tumor. En el tumor de colon derecho, se deberá realizar una Hemicolectomía derecha con movilización del ángulo hepático, ligadura de vasos ileocólicos y cólicas derecha y media. La anastomosis ileotransversa puede ser manual ó mecánica.

En el tumor de localización izquierda, se realizará una Hemicolectomía izquierda con movilización de la flexura esplénica, ligadura de vasos cólicos izquierdos (mesentéricos izquierdos), y anastomosis mecánica o manual.

Se actuará de igual forma en los tumores sigmoideos, pero respetando la cólica izquierda.

En los tumores de la unión rectosigmoidea, se realizará una Resección anterior baja (RAB), y se aconseja realizar una ileostomía de protección transitoria.

La técnica en las neoplasias rectales, incluye la escisión total del mesorrecto (ETM) y linfadenectomía completa inferior, ya que la afectación circunferencial del mesorrecto modifica el índice de recidiva y el de supervivencia. La ETM ha condicionado un descenso de las recidivas locales desde un 30% a un 5-8%.

El margen oncológico distal en el recto, se acepta que sea de 2 cm, con lo que se consigue en la mayoría de los casos la preservación esfinteriana.

A pesar de esto, existen ocasiones en que la proximidad del tumor al margen anal, obliga a realizar amputación abdominoperiáneal (Intervención de Miles) con colostomía definitiva.

El abordaje laparoscópico tiene resultados similares a la cirugía convencional tanto en morbimortalidad como en supervivencia, igual que la cirugía Robótica, mejorando el dolor y el ileo postoperatorio, así como la estancia postoperatoria.

Es útil, ya que parece existir mejor recuperación de los pacientes, la preparación mediante Fast-track y ERES (enhanced recovery after surgery, o Rehabilitación multimodal).

En pacientes con tumores rectales estadio T1N0M0 que tienen una afectación de menos del 40% de la circunferencia rectal, un tamaño inferior a 4 cm, y están situados a menos de 10 cm del margen anal, bien o moderadamente diferenciados, y sin invasión vascular o linfática, la

resección transanal (TAMIS) es una alternativa válida que se está desarrollando ampliamente en la actualidad.

Se debe realizar una consideración especial sobre el Tratamiento quirúrgico en los pacientes con formas hereditarias de CCR. Actualmente, no existen datos para ofrecer Colectomía profiláctica a pacientes afectados de Síndrome de Lynch, de alto riesgo o con mutación de genes responsables. También, se debería ofrecer una histerectomía y doble anexectomía a las mujeres afectas que ya hayan completado su deseo reproductivo, por la mayor incidencia en estas de cáncer de endometrio y ovario.

De igual forma, debería ser considerada en aquellos pacientes que no vayan a adherirse a medidas de cribado anual endoscópico, ya que estos pacientes tienen mayor riesgo de presentar tumores metacrónicos y una progresión más rápida desde el adenoma.

El Tratamiento postquirúrgico o Adyuvante de las neoplasias de colon, depende del Estadío de este:

- En los Estadios 0 y I, la lesión está limitada a la mucosa y muscular, por tanto, no es necesario tratamiento adyuvante.
- En Estadíos II se aconseja el tratamiento con quimioterapia (QT), cuando el tumor tenga factores de riesgo de mal pronóstico:
  - \* Grado de diferenciación G3 ó G4 (indiferenciados)
  - \* Tumor T4, invasión de órganos adyacentes y/o invasión peritoneal.
  - \* Invasión vascular o perineural en el estudio histopatológico.



\* Presentación de la neoplasia con Obstrucción o Perforación.

\* Número de ganglios estudiados en la pieza anatomopatológica insuficiente (puede conllevar infraestadificación).

En estos casos se aconseja el uso de Fluoropirimidinas (Capecitabina). Los estudios MOSAIC y QUASAR<sub>(92,93)</sub> han demostrado una mejoría en supervivencia global con el uso de pautas de 5-fluorouracilo en pacientes en estadio II, con un potencial beneficio respecto a la toxicidad relacionada con el tratamiento.

Hay que tener en cuenta que los tumores con inestabilidad de microsatélites no parecen beneficiarse del tratamiento adyuvante con 5-fluorouracilo, por lo que la determinación de esta alteración puede ser de utilidad en la toma de decisiones referentes al uso de quimioterapia adyuvante en los pacientes de bajo riesgo en estadio II.

Si los Factores de riesgo son mayores, como T4 muy indiferenciados, se propone el uso de Fluopirimidinas con Oxaliplatino (FOLFOX), que aumenta la supervivencia global y libre de enfermedad en un 4,2% a los 5 años.

- En Estadíos III, también tumores localmente avanzados, es más alta la probabilidad de recidiva local ó metástasis a distancia, por lo que es aconsejable realizar tratamiento quimioterápico

para reducir estas, e incrementar la supervivencia, utilizando el esquema FOLFOX, igual que en Estadío II .

En los pacientes mayores de 70 años y debido a la toxicidad del Oxaliplatino, y al mayor porcentaje de comorbilidades que padecen, se aconseja tratamiento sólo con Fluopirimidinas. Si está contraindicado el uso de Oxaliplatino, se pueden utilizar esquemas de Capecitabina con Leucovorín ó solo Capecitabina.

En las neoplasias de Recto, se ha demostrado una menor incidencia de recidivas locales y toxicidad con pautas de quimioradioterapia preoperatorias (Fluopirimidinas + RT) en Estadío I, y en estadío II adyuvancia con Fluopirimidinas con/sin Oxaliplatino. (94,95)

- En Estadíos IV - hasta un 50% de los pacientes desarrollarán diseminación metastásica hepática, bien sincrónicas (15-25%) ó metacrónicas (75-85%), y sólo el 20% serán susceptibles de Cirugía resectiva.

El desarrollo de estas metástasis conlleva un mal pronóstico a largo plazo, disminuyendo la supervivencia a los 5 años al 25% en los tratados resecados y menos del 5% si la enfermedad hepática es irresecable.

Se consideran resecables aquellos pacientes que no tengan enfermedad metastásica extrahepática, con número de lesiones inferior a 5, y siempre que la resección deje un volumen hepático adecuado para impedir insuficiencia hepática.

Una alternativa terapéutica para pacientes no resecables, sería la ablación de las metástasis mediante radiofrecuencia.

La Quimioterapia paliativa permite mejorar la calidad de vida y la supervivencia de estos pacientes, y en ocasiones permite realizar un rescate quirúrgico de lesiones previamente irresecables. Con la adición al 5- Fluoracilo de Oxaliplatino, Irinotecan y terapias biológicas dirigidas, se ha conseguido incrementar la supervivencia de estos pacientes desde los 12 meses hasta los dos años.

Las Terapias Biológicas<sup>(96)</sup> han supuesto un gran avance en los últimos años en el tratamiento de estos pacientes, y son principalmente tres:

- Cetuximab – anticuerpo monoclonal contra el receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR)
- Bevacizumab – anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)
- Panitumumab – anticuerpo monoclonal humanizado contra EGFR.

Se ha identificado que la presencia de mutaciones en el gen KRAS, es un predictor de respuesta a terapias contra el factor de crecimiento endotelial (anti-EGFR), por lo que cetuximab y panitumumab sólo deben ofrecerse a los pacientes con CCR sin mutaciones KRAS (wild-type KRAS)<sup>(97)</sup>.

Las recomendaciones actuales para el uso de Anticuerpos Monoclonales en el tratamiento de primera línea de CCR Metastásico, son:

1. KRAS nativo (wild-type KRAS), paciente con buen estado físico y esperanza de vida de más de tres meses:
  - Sin Comorbilidades que contraindiquen:
    - Oxaliplatino → Cetuximab + FOLFIRI (Leucovorin + Fluoruracilo + Irinotecán)
    - Irinotecán → Panitumumab + FOLFOX (5-Fluoruracilo + Leucovorín + Oxaliplatino)
  - Con Comorbilidades, Factores de Riesgo ó con Metástasis Hepáticas que se vayan a reseca → Cetuximab + FOLFIRI (Irinotecan + Leucovorín + 5-Fluoracilo)
  - Con contraindicación ó intolerancia a anticuerpos-EGFR → Bevacizumab + XELOX (Capecitabina + Oxaliplatino) ó FOLFOX 4 .
2. K-RAS mutado, buen estado físico y esperanza de vida de más de tres meses, → Bevacizumab + XELOX (Capecitabina + Oxaliplatino) o FOLFOX 4. <sup>(96)</sup>

El Tratamiento con radioterapia (RT) en los tumores de recto se utilizará cuando sean T4 adheridos a otros órganos adyacentes o haya signos de recidiva local.

En el Recto, la adyuvancia con RT es más efectiva y menos tóxica que en postoperatorio. Asociada a QT preoperatoria, disminuye la tasa de recidiva local y puede aumentar la supervivencia global. De igual forma aumenta la supervivencia libre de enfermedad. (98).

## **5. PREVENCIÓN DE CCR.**

El mejor conocimiento de la historia natural y factores patogénicos y genéticos del CCR permite realizar programas preventivos para evitar la progresión desde el adenoma, es decir su aparición (Prevención ó Profilaxis Primaria), para su detección de forma precoz (Profilaxis Secundaria) ó mejorar el pronóstico del paciente (Profilaxis Terciaria).

### **PREVENCIÓN PRIMARIA.**

Actúa con la eliminación de los Factores implicados en el desarrollo del CCR, a través de cambios en la dieta y la Quimioprofilaxis.<sup>(99,100)</sup>

Como ya se ha explicado, numerosos estudios observacionales y prospectivos<sup>(35,36,37,39)</sup>, llevan a aconsejar el cambio de los hábitos dietéticos encaminados a la reducción del consumo de grasas y calorías, evitando de esta forma el sobrepeso, así como un aumento de la ingesta de fibras.

Además los niveles altos de actividad física, se han asociado a un menor riesgo de mortalidad por cáncer específica y Colorrectal global, y tienen un impacto beneficioso en la fatiga, la calidad de vida y el estado funcional. Así lo aconseja la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) en la actualización de 2013.

El tabaquismo, también se asocia a un mayor riesgo en la aparición de CCR y continuar con el consumo de cigarrillos se ha asociado con un mayor riesgo de mortalidad por CCR. <sup>(58)</sup>

Igual ocurre con el alcohol <sup>(59)</sup>.

Respecto a la Quimiopprofilaxis, los AINES son los agentes más prometedores para la prevención del CCR, demostrándose en distintos estudios la reducción en la incidencia de CCR (hasta en el 50%) y en la inhibición de la secuencia adenoma-carcinoma, incluso en la disminución de la mortalidad entre los usuarios de AINES, hallado en al menos tres estudios (101, 102, 103).

La primera evidencia directa se encontró en pacientes afectados de PAF en tratamiento con Sundilac por tumores desmoides, en los que este fármaco no actuó en la historia natural de los desmoides, pero al ser dosis antiinflamatorias, se demostró una regresión de pólipos rectales coexistentes, confirmándose este efecto posteriormente en ensayos aleatorios (104,105)

La regresión de adenomas fue descrito con el tratamiento de pacientes con Poliposis adenomatosa familiar (PAF) con Celecoxib, inhibidor selectivo de COX-2 (106)

Estos estudios son importantes ya que no solo demuestran que la modulación terapéutica de la secuencia adenoma-carcinoma puede realizarse con efectividad relativamente tarde, sino que también que pudiera ser efectivo en casos de CCR esporádico, y no sólo en los CCR familiares.

A pesar de este efecto favorable, se desconoce su beneficio neto, por lo que en la Actualización de la guía clínica de la ASCO de 2013, no recomienda esta estrategia terapéutica de manera sistemática.

## **PREVENCIÓN SECUNDARIA.**

En este caso, está dirigida a la detección precoz de las neoplasias CCR con programas de cribado específicos para cada grupo de riesgo, que ya se han comentado con anterioridad.

Esta enfermedad, al tener una historia natural reconocida, con largo periodo sin síntomas y lesiones premalignas detectables, reconocibles y fácilmente tratables mediante la colonoscopia, es considerada como tributaria de un programa de cribado poblacional, con un coste-efectividad muy rentable y que además es capaz de reducir la mortalidad asociada.

Se ha demostrado que el TSOH (test de sangre oculta en heces) en mayores de 50 años, disminuye la mortalidad por CCR, al detectarla en fases más precoces y presintomáticas. En un ensayo clínico y en estudios observacionales, se ha confirmado la capacidad de la Sigmoidoscopia y Colonoscopia, para reducir la incidencia de CCR en un 20% y la mortalidad por CCR en más de un 30%.

En familias con Síndrome de Lynch la práctica de una colonoscopia anual o bianual a partir de los 25-30 años, reduce la incidencia y mortalidad por CCR en estos pacientes. En estos, y en las familias afectas de PAF, podría realizarse análisis mutacional de los genes reparadores de ADN (MHS2, MLH1, MSH6 y PMS2) o del gen APC, respectivamente.

De igual forma, parece necesario incluir a familiares de primer grado de pacientes afectos de CCR en programas de cribado específicos, sobre todo si es un número elevado de familiares afectos o con edad temprana en el diagnóstico. La periodicidad y la edad de inicio de las exploraciones endoscópicas dependerán de la historia familiar de CCR.



### **PROFILAXIS TERCIARIA.**

Basada en programas de vigilancia para mejorar el pronóstico de los pacientes afectos de CCR, dirigidas a la detección precoz de las recidivas o de lesiones metacrónicas.

Diversos estudios y metaanálisis recientes demuestran el beneficio del control clínico periódico, de la determinación de niveles de CEA, colonoscopia y pruebas radiológicas, aunque no se han establecido cual ha de ser la frecuencia óptima con la que se deben realizar estas pruebas.

(107,108)

El aumento de los niveles del marcador tumoral antígeno Carcinoembrionario (CEA), nos puede hacer sospechar de la aparición de recidiva o lesión metastásica, por lo que está indicado la realización de TAC toracoabdominal. Si no aparecen lesiones sospechosas detectables o aparece una única lesión con dudas de si es metastásica, o imposible de diferenciar si son debidos a cambios postquirúrgicos o recurrencia local de la enfermedad, se aconseja solicitar PET-TAC, que aportan una estadificación más precisa previa a la resección con fines curativos.

# JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS.

---

Múltiples estudios apoyan la teoría de que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) reducen el riesgo de padecer cáncer Colorrectal (CCR). De igual forma otros estudios avalan que podría reducir la incidencia de CCR, inducido en animales de experimentación <sup>(109, 110)</sup>.

La inhibición de la carcinogénesis del CCR por los AINES, está modulada por la producción de las Prostaglandinas, por unas enzimas conocidas como Ciclooxygenasas (COX), que se transcriben por dos genes concretos, COX-1 y COX-2. La COX-1 se expresa en la mayoría de los tejidos. La expresión del COX-2 se activa sin embargo por una amplia variedad de estímulos, entre ellos la inflamación aguda o crónica, el oncogen ras y scr, la interleukina 1 (IL-1), hipoxia, benzopireno, luz ultravioleta, el Factor de crecimiento epidérmico y Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

Las COX catalizan los primeros pasos en la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas (PG), siendo la COX-2 responsable de la síntesis de PG E, que inhibe la apoptosis y se asocia con la aparición de metástasis tumorales. También es responsable de la inducción de la Interleukina 6 (IL-6), que ha sido relacionada con la invasión de las células cancerosas, y de la Haptoglobina, que estimula la angiogénesis y la implantación de las células tumorales.

Como ya se ha dicho, existe una sobreexpresión de COX-2 en el 85-90% de los CCR, por lo que los inhibidores de la COX-2 podrían actuar como quimiopreventivos, ya que reducen en un 40% la formación de criptas aberrantes<sup>(111)</sup> y la multiplicación de células tumorales, por el efecto antiangiogénico, antiproliferativo y proapoptótico.

De igual forma, también se encuentra una sobreexpresión de esta en los pólipos (en el 50% de los adenomas) y se ha apreciado que, conforme aumenta el tamaño del adenoma, aumentan los niveles de COX-2, estando en prácticamente todos los adenocarcinomas <sup>(112,113)</sup>.

El efecto del Rofecoxib fue ampliamente estudiado<sup>(114)</sup> y aprobado para su uso como analgésico, aunque la mayor incidencia de efectos vasculares, motivó la retirada del mismo. Es el inhibidor más potente y conocido de la COX-2

Aún hoy, por su potente efectos antiproliferativos, se siguen estudiando los posibles efectos beneficiosos que podrían tener estos inhibidores específicos de la COX-2 en adición a otros tratamientos, como manejo quimioprolifático en pacientes susceptibles de desarrollar CCR, en las recidivas e incluso para prevenir ó tratar las metástasis hepáticas  
(115, 116, 117).

# OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

---

Se ha comprobado de forma experimental la sobreexpresión de la Ciclooxygenasa-2 (COX-2) en los adenomas y adenocarcinomas de colon, por lo que los inhibidores específicos de dicha enzima, podrían tener un efecto quimiopreventivo.

El Objetivo principal de este estudio es investigar la inhibición de la Ciclooxygenasa 2 en un modelo de carcinogénesis cólica inducida de forma farmacológica en la rata.

Los Objetivos concretos son los siguientes:

1. Estudio de la inhibición de la tumorigénesis del cáncer colorectal, con un inhibidor específico de la Ciclooxygenasa 2 (COX-2), Rofecoxib, en distintas fases de la misma.
2. Análisis de las formas anatomopatológicas de presentación del cáncer colorectal en el animal de experimentación, induciendo la tumorigénesis con Azoximetano, y su posibles modificaciones con la administración de Rofecoxib.
3. Analizar la capacidad de Rofecoxib de inhibir ó reducir las metástasis de Cáncer colorectal (CCR) en este estudio.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## **1. MATERIAL.**

### **1.1.- LABORATORIO.**

Este estudio experimental fue llevado a cabo en el animalario de la Facultad de Medicina de Sevilla. Se habilitó una dependencia donde colocar a todos los animales incluidos en el estudio, así como todo el material necesario para completar el mismo (básculas, jeringas, instrumentos...).

El personal de mantenimiento del animalario, fueron los encargados de la alimentación de los animales, mediante pienso especial para ratas, y de la limpieza de las jaulas y la instalación donde se ubicaban.

De la administración del agua de bebida, procedente de la red, nos encargamos los investigadores, debido a la dilución en esta de las dosis de Azoximetano y Rofecoxib, de forma diaria y durante todo el tiempo que duró el estudio.

La temperatura ambiente de la estancia fue de entre 20° y 24°C. , controlado mediante sistema de aire acondicionado y con un grado de humedad entre el 40 y el 60%.

Las autopsias y laparotomías de los animales fueron llevadas a cabo en una dependencia contigua, donde eran trasladadas las ratas inmediatamente después de ser sacrificadas.

## **1.2 – ANIMALES.**

Utilizamos ratas de laboratorio de la raza Wistar, de aproximadamente dos meses y medio de edad y criadas en el animalario de la Facultad de Medicina.

En total fueron 88 ratas, de las cuales 44 fueron machos y 44 hembras, distribuidas en 3 grupos de 26 ratas (cada uno de ellos con 13 machos y 13 hembras), y un cuarto grupo control con 10 ratas (5 machos y 5 hembras).

Fueron distribuidas en 20 jaulas, de 35 cm de ancho, 60 de largo y 20 cm de altura. Cada una contiene entre 4 y 5 animales, de tal forma que existen dos jaulas para cada grupo (grupos 1, 2 y 3) con 4 animales y una con 5 animales, haciéndose de esta forma por la temporalidad en la que se van a administrar los fármacos. En el grupo control, grupo 4, se pusieron dos jaulas cada una con 5 machos y 5 hembras. (Tabla 1)

El estudio se inició cuando los animales tenían unos dos meses y medio de edad, y como el proyecto tenía una duración estimada de 52 semanas, se hizo necesario un seguimiento del peso de las ratas hasta su estabilización con el crecimiento (en la semana 21), así como el consumo de agua, para realizar el cálculo de la dosis a administrar de Rofecoxib, que se administra disuelto en ella.

GRUPOS	JAULAS			TOTAL	JAULAS			TOTAL	TOTAL
	HEMBRAS			HEMBRAS	MACHOS			MACHOS	GRUPOS
<b>1</b>	4	4	5	13	4	1	4	4	5
<b>2</b>	4	4	5	13	4	2	4	4	5
<b>3</b>	4	4	5	13	4	3	4	4	5
<b>4</b>	5			5	5			5	10
	<b>TOTAL</b>			<b>44</b>				<b>44</b>	<b>88</b>

Tabla 4 – Distribución de jaulas. Grupo 1 y 2 Rofecoxib. Grupo 3 Azoximetano. Grupo 4 Control

Todo lo anterior se realiza cumpliendo la directrices marcadas por la Comunidad Económica Europea 86/609/CEE y la recomendación de la Comisión 2007/526/CE <sup>(118)</sup>, así como por el Real Decreto 223/1998<sup>(119)</sup>, relativas al cuidado y alojamiento de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.



### **1.3.- AZOXYMETANO.**

El AOM o Azoxymethane es el carcinógeno empleado en el estudio, adquirido por solicitud a los laboratorios Sigma-Aldrich.

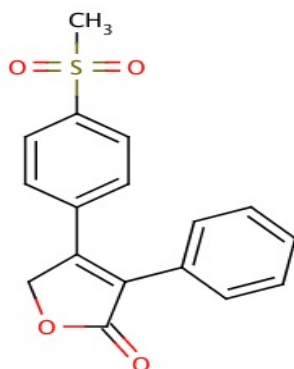
Este producto, cuya fórmula química es  $C_2H_6N_2O$ , con peso molecular 74,08 gr/mol, se suministró en ampollas de vidrio de 0.1 ml, protegidas de la luz, con una pureza de 0.991 gr/ml, peso específico de 0.991 gr/ml, siendo solubles en agua, etanol y éter, con un punto de ebullición entre 97° y 99°C.

La dosis empleada de Azoxymetano fue de 15 mgr/Kg/día, administrado por inyección subcutánea por punción con agujas de insulina.

#### 1.4.- ROFECOXIB.

El Rofecoxib utilizado en el estudio fue el producto comercializado por MSD (Merck, Sharp & Dohme) con el nombre comercial Vioxx®, aprobado para el tratamiento de osteoartritis, dolor agudo moderado y dismenorreas. Se presenta en cajas de 14 tabletas de 25 mgr cada una.

Su fórmula empírica es  $C_{17}H_{14}O_4S$  y tiene un peso molecular de 314.36 gr/mol.



Es metabolizado en el hígado, mediante excreción biliar primaria, y se recupera en la orina en su forma original aproximadamente 1.1% de la dosis administrada. El Rofecoxib se elimina casi exclusivamente por transformación metabólica y excreción renal. Sus metabolitos no son activos en cuanto a la inhibición de las ciclooxygenasas 1 y 2.

El Rofecoxib es insoluble en agua (solubilidad de 4.6 microgr/ml) y soluble en etanol (380 microgr/ml). Por esto, su administración requiere manipulación para la disolución y la administración en el agua de bebida a las dosis correctas.

La dosis de Rofecoxib administrada fue de 0.36 mgr/Kg/d.

### **1.5.- MATERIAL ANESTÉSICO Y QUIRÚRGICO .**

Dado que era necesario realizar pesados de las ratas y administración de Azoxymetano de forma individualizada, fue necesario proceder a la sedación de las mismas mediante métodos anestésicos. Para ello, se utilizó una caja de plástico rígida y transparente, con tapadera, en la que se introducían a las ratas para dormir las, utilizando para ello éter sulfúrico.

También se utilizó material complementario de laboratorio, para la preparación de los fármacos:

- Etanol, vasos de precipitados, varilla de vidrio, probetas y recipientes de plástico con capacidad de 2 litros para realizar las diluciones.
- Jeringas con agujas de insulina para la administración del Azoxymetano. Debido a la toxicidad de este, se utilizaron medidas de protección en su manipulación (guantes, gafas y mascarillas protectoras, batas protectoras y sistema de escape de humos).
- El agua de bebida, con el Rofecoxib en dilución, se almacenaba en dos recipientes de 25 litros de capacidad (uno para machos y otro para las hembras).
- Material Quirúrgico utilizado para las laparotomías y extracción de piezas: bisturíes, tijeras, guantes desechables, paños quirúrgicos, gasas, formol taponado 10% y recipientes con cierre hermético para guardar las piezas.

## 2. MÉTODOS.

### 2.1. DURACIÓN DEL ESTUDIO.

La duración total del estudio fue de 52 semanas, para poder observar el efecto del Rofecoxib en la progresión de la carcinogénesis y su efecto inhibitor después de la administración del carcinógeno químico (110,114,120).

La administración de los fármacos se realizó:

- **Grupo 1:** Administración de Rofecoxib desde la semana 1 del estudio hasta la finalización del mismo en la semana 52, todos los días.  
Se inicia dos semanas después la administración de Azoxymetano en tres ocasiones y en una sola dosis, en las semanas 3, 9 y 10 del estudio.
- **Grupo 2:** Administración de Rofecoxib en la semana 7 del estudio y hasta la semana 52 del estudio, diariamente.  
Igual que en el grupo anterior, se administra el Azoxymetano en tres ocasiones y en una sola dosis, en las semanas 3, 9 y 10 del estudio.

- **Grupo 3:** Administración únicamente de Azoxymetano en las mismas demanas que los grupos anteriores, es decir, en la 3, 9 y 10.
- **Grupo 4:** Grupo control, por lo que no se les administra ningún fármaco.

Para el cálculo de las dosis a administrar, que se realiza según el peso del animal, se realizan mediciones de pesado en las semanas 1, 3, 5,7, 9, 10, 13, 17, 21 y 52.

En la semana 52, se procede al sacrificio de los animales, para el análisis de los mismos.

SEMANA Nº	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
1	<b>Inicio Rofecoxib hasta semana 52</b>  Pesado	Pesado	Pesado	Pesado
3	<b>Azoxymetano</b>  Pesado	<b>Azoxymetano</b>  Pesado	<b>Azoxymetano</b>  Pesado	Pesado
5	Pesado	Pesado	Pesado	Pesado
7	Pesado	<b>Inicio Rofecoxib hasta semana 52</b>  Pesado	Pesado	Pesado
9	<b>Azoxymetano</b>  Pesado	<b>Azoxymetano</b>  Pesado	<b>Azoxymetano</b>  Pesado	Pesado
10	<b>Azoxymetano</b>  Pesado	<b>Azoxymetano</b>  Pesado	<b>Azoxymetano</b>  Pesado	Pesado
13	Pesado	Pesado	Pesado	Pesado
17	Pesado	Pesado	Pesado	Pesado
21	Pesado	Pesado	Pesado	Pesado
52	<b>Sacrificio</b>	<b>Sacrificio</b>	<b>Sacrificio</b>	<b>Sacrificio</b>

Tabla 5 – *Tiempos en el estudio.*

## **2.2 – PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS.**

### **2.2.1 – Pesos de los animales y consumo de agua.**

Fue necesario para la administración de las dosis correctas del fármaco y del Azoxymetano, el pesado de las ratas.

Este control, como ya se ha explicado se realizó en nueve ocasiones en todos los grupos.

El procedimiento para llevarlo a cabo se realizó de forma estandarizada:

- Anestesia de las ratas.
- Pesado y cálculo de la dosis a administrar
- Administración .

La evolución de los pesos fue progresiva durante las primeras 13 semanas, estabilizándose el peso a partir de la semana 21.

No hubo diferencias significativas entre los grupos (Tabla 3)

<b>SEMANAS</b>	<b>Peso medio de los Machos (gr.)</b>	<b>Peso medio de las Hembras (gr.)</b>
<b>1</b>	508	276
<b>3</b>	525	280
<b>5</b>	550	295
<b>7</b>	565	300
<b>9</b>	580	304
<b>10</b>	585	308
<b>13</b>	600	312
<b>17</b>	605	314
<b>21</b>	606	314

Tabla 6 – Peso medio de ratas.

El control del consumo del agua fue necesario para el cálculo de la dosis de Rofecoxib. Este cálculo se realizó en todos los grupos desde el día 1 de inicio del estudio, cuando se llenan los recipientes de las jaulas y anotando la fecha de reposición y volumen repuesto en cada ocasión en cada bote, lo que permite calcular la cantidad de agua consumida diariamente por cada rata. El consumo de agua, al igual que el peso, se estabilizó a partir de la semana 21. No se apreciaron diferencias significativas en el consumo de agua de cada grupo. (Tabla 4)



<b>Consumo medio de agua por rata al día durante las primeras semanas.</b>		
<b>Semanas</b>	<b>Machos ml/día</b>	<b>Hembras ml/día</b>
<b>2</b>	<b>37</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>44</b>	<b>36</b>
<b>9</b>	<b>50</b>	<b>42</b>
<b>13</b>	<b>60</b>	<b>49</b>
<b>17</b>	<b>69</b>	<b>53</b>
<b>21</b>	<b>70</b>	<b>52</b>

Tabla 7 – Consumo medio de agua por semanas.

### **2.2.2. Administración de Rofecoxib**

La forma de presentación comercial del Rofecoxib precisó de dilución en alcohol para posteriormente diluirlo en el agua de la bebida para administrarla a las ratas. Por ello, fue necesario considerar que:

- Al partir de animales con dos meses de edad, y el rápido crecimiento de estos animales en las primeras semanas de su desarrollo, se precisó realizar el peso de los animales para administrar la dosis adecuada de Rofecoxib. (Tabla 3)
- El consumo de agua varía según el peso de los animales. Por esto también fue necesario calcular el consumo de agua, y las diferencias entre machos y hembras (Tabla 4), como ya se ha explicado.

La preparación del Rofecoxib en el agua de la bebida, precisó crear tres diluciones distintas:

1. Disolución de la tableta de 25 mgr de Rofecoxib en 10 ml de etanol, de lo que resulta 2.5 mgr/ml ó 2.500mgr/L., con un máximo de 380 µgr/ml de etanol).
2. Dilución hidroalcohólica o Solución madre, que resulta de diluir la disolución anterior en agua hasta conseguir un litro de la mezcla, según la fórmula:

$$V_a \times C_a = V_b \times C_b \Rightarrow C_b = V_a \times C_a / V_b$$

Siendo:

$V_a$  = volumen de la dilución 1, es decir 0.01

$C_a$  = concentración de Rofecoxib en en la dilución 1, 2.500 mgr/L

$V_b$  = volumen de la dilución 2, que es la Solución madre hidroalcohólica, ósea, 1L.

$C_b$  = concentración de la Solución 2, resultando 25 mgr/L.

Así:

$$C_b = V_a \times C_a / V_b = 0.01 \times 2500 / 1 = 25 \text{ mg/L.}$$

3. La solución madre obtenida en la operación anterior, es lo que hay que añadir a cada litro de agua de bebida de la rata, teniendo en cuenta su peso y consumo medio diario.

Al iniciar el estudio en la primera semana, se calculó un consumo de agua de 37 ml/día para los machos, y 30 ml/día para las hembras, siendo el peso medio de los machos de 508 mg y de 276 gr en las hembras.

Al dosificar el Rofecoxib 0.36 mg/Kg/día, y teniendo en cuenta lo anterior (peso y consumo de agua diario), obtenemos una dosis de Rofecoxib inicial para los machos de 0,183 mg (contenidos en los 37 ml de consumo diario de agua) y para las hembras de 0.099 mg (contenidos en los 30 ml de consumo diario de agua).

Cada litro de agua de bebida contiene 4,94 mg de Rofecoxib para los machos, y de 3,312 mg para las hembras.

La cantidad de Solución madre a agregar a cada litro de agua de bebida fue de 24,7 ml en la de los machos y de 16,56 ml en la de las hembras (tabla 5).

	<b>Dosis mg/peso</b>	<b>Concentración de Rofecoxib en mg/L agua bebida</b>	<b>Solución madre en 1 L de agua de bebida.</b>
<b>Machos:</b>  508 gr.  37 ml agua/día	0,183	4,94	24,7
<b>Hembras:</b>  276 gr.  30 ml agua/día.	0,099	3,312	16,56

Tabla 8 – Dosis Rofecoxib en la semana 1.

De acuerdo con el crecimiento e incremento del peso de los animales, hubo que adaptar y modificar las diluciones a estos nuevos pesos que se registraron en nueve ocasiones, en las semanas 1, 3, 5, 7, 9, 10, 13, 17 y 21.

En los dos últimos registros, semanas 17 y 21, se estabilizaron las medidas de consumo de agua y peso, por lo que los datos se mantuvieron hasta el final del estudio.

	<b>Dosis mg/peso</b>	<b>Concentración de Rofecoxib en mg/L agua bebida</b>	<b>Solución madre en 1 L de agua de bebida.</b>
<b>Machos: 606 gr. 70 ml agua/día</b>	0.218	3,14	15,7
<b>Hembras: 314 gr. 52 ml agua/día.</b>	0.113	2,173	10,86

Tabla 9 - Dosis Rofecoxib desde estabilización del peso.

### **2.2.3. Administración de Azoximetano.**

Ya se ha explicado que el Azoximetano se presenta en ampollas de vidrio de 0,1 ml., con una pureza de 0,99 gr/L. Al ser tan escasa la cantidad del producto, se procedió a su dilución en 9.9 cc de suero fisiológico para facilitar su manipulación y administración. Con esto, se obtiene una disolución de 10 cc conteniendo 100 mg de Azoximetano.

La dosis utilizada fue de 15 mg/Kg/ dosis, lo que significa 1,5 cc/kg/dosis de la dilución creada.

El Azoximetano se administró en tres ocasiones, en las semanas 3, 9 y 10.

Siempre se administró la misma dosis, 15 mg/Kg, y siguiendo los controles de peso que se realizaron a los animales para una correcta dosificación.

Sin embargo, y a diferencia de los cálculos para la administración del Rofecoxib, en los que se utilizó la media de los pesos de cada sexo de los animales, para la administración del Azoximetano, se realizó un cálculo individualizado para cada animal y según el peso de este en el momento de la administración.

El procedimiento se estandarizó en cuatro fases que se siguieron en las tres ocasiones en las que se administró.

1. Anestesia de los animales.
2. Pesado de la rata.
3. Cálculo de la dosis a administrar.
4. Administración de Azoximetano.

Con esto logramos que no existan errores en los cálculos de las dosis y excesiva manipulación del Azoximetano, por su toxicidad.

Se utilizaron jeringas y agujas de insulina para la inyección subcutánea del Azoxymetano en la región interescapular.

La cantidad de Azoxymetano utilizado puede observarse en las Tablas 7, 8 y 9.

<b>PRIMERA DOSIS DE AZOXYMETANO</b>	<b>Peso total del animal en gr.</b>	<b>Azoxymetano (mg)</b>	<b>Ampollas de Azoxymetano</b>
<b>Machos</b>	18.720	280,8	2,81
<b>Hembras</b>	10.900	163,5	1,63
<b>Total</b>	29.620	444,3	4,44

Tabla 10 – Primera dosis de Azoximetano en semana 3.

<b>SEGUNDA DOSIS DE AZOXYMETANO</b>	<b>Peso total del animal en gr</b>	<b>Azoxymetano (mg)</b>	<b>Ampollas de Azoxymetano</b>
<b>Machos</b>	20.495.	307,425	3,07
<b>Hembras</b>	11.990	179,850	1,79
<b>Total</b>	32.485	487,275	4,86

Tabla 11 – Segunda dosis de Azoximetano en la semana 9.

<b>TERCERA DOSIS DE AZOXYMETANO</b>	<b>Peso total del animal en gr</b>	<b>Azoxymetano (mg)</b>	<b>Ampollas de Azoxymetano</b>
<b>Machos</b>	21.250	318,75	3,18
<b>Hembras</b>	12.300	184,5	1,84
<b>Total</b>	33.550	503,25	5,02

Tabla 12 – Tercera dosis de Azoximetano en la semana 10.

### **2.3. MÉTODOS ANESTÉSICOS.**

El método utilizado para anestesiar a los animales, debía ser rápido, fácil y seguro, ya que hubo que dormirlos varias veces durante el estudio, y el sacrificio al final del mismo.

Se usó un recipiente cúbico transparente, con una tapa en la parte superior, de unos 20 cm de altura. El fondo de este recipiente se cubrió con algodón y se impregnó con éter. La rata se introducía en el recipiente, que se cerraba con la tapa, siendo observada hasta que quedaba inmóvil, momento en el cual se sacaba y se procedía a la acción prevista, bien pesado ó pesado e inyección de Azoxymetano.

El animal tardaba en dormirse entre 15 y 30 segundos, con lo que se disponía de 30 a 45 segundos con el animal anestesiado. Algunas, tuvieron un despertar precoz, pero siempre de forma gradual. No pereció ninguna accidentalmente por exceso anestésico.

La misma acción se realizó en la semana 52 del estudio, para proceder al sacrificio del animal y posterior laparotomía, pero el tiempo en el que se dejaba el animal en la caja dependía del fallecimiento de este.

## **2.4. MÉTODOS QUIRÚRGICOS.**

La obtención de las muestras a analizar se realizó en el quirófano experimental del animalario. La rata sacrificada en la semana 52 era trasladada hasta el quirófano, anotando número del animal, sexo y grupo en el que estaba incluido.

Se procedía a realizar una laparotomía en línea media desde el cuello hasta el final del abdomen, mediante bisturí y completando la apertura con tijeras.

Se observó cuidadosamente la existencia de adenopatías y anotó el estado macroscópico de las vísceras. Se procedió entonces a la extirpación del colon en su totalidad, desde la válvula ileocecal al ano, y a la apertura del mismo longitudinalmente por el borde antimesentérico.

Se lavó con agua corriente, para apreciar y anotar la existencia de pólipos y tumores macroscópicos.

Las muestras fueron fijadas en formol al 10% y etiquetadas en el recipiente en que se introducían, indicando mediante un primer número según el ordinal del animal, seguidos de las letras M o H según fueran machos o hembras, y a continuación otro número que correspondía al grupo al que pertenecía (1, 2, 3 ó 4).

A continuación eran trasladadas a Anatomía Patológica para su análisis.



## **2.5 MÉTODOS ANATOMOPATOLÓGICOS.**

Los animales que sobrevivieron al estudio fueron 53 en total, obteniéndose un total de 76 muestras, 31 del grupo 1, 18 de grupo 2, 18 del grupo 3 y 9 del grupo 4 (control).

Se muestra con más claridad en la Tabla 10.

<b>GRUPO</b>	<b>Número de animales que terminan estudio</b>	<b>Número de muestras obtenidas</b>
<b>1</b>	17 8 machos y 9 hembras	22
<b>2</b>	11 6 machos y 5 hembras	15
<b>3</b>	16 6 machos y 10 hembras	18
<b>4</b>	9 4 machos y 5 hembras	55

Tabla 13 – Muestras obtenidas al finalizar el estudio.

A los animales que fallecieron durante el estudio, no se les realizó estudio postmortem, ya que aunque fueron guardados en cámaras de congelación inmediatamente después, los cuerpos presentaban un alto grado de autólisis que impedía un adecuado análisis de las muestras.

Como ya se ha explicado, una vez sacrificados los animales, se procedió a la extracción del colon en su totalidad, practicando un estudio postmortem del animal para ver si existían nódulos metastásicos. Tras la apertura del colon por su borde antimesentérico longitudinalmente, este fue lavado con agua y estirado mediante alfileres en un corcho para observar con facilidad toda la superficie de la mucosa colónica. De esta forma, se contabilizaron las lesiones tumorales que existían en cada pieza.

Una vez extendidas las piezas en el corcho, fueron introducidas en un recipiente con formol al 10% durante 48 horas. De nuevo, las piezas se lavaron con agua, tallándose las lesiones tumorales invasivas y no invasivas, junto con la mucosa adyacente. Las piezas tumorales eran incluidas en su totalidad.

Se actuó de la misma forma para los otros órganos afectados que fueron encontrados, estudiándose solamente aquellas que eran sospechosas de ser lesiones tumorales.

Para el estudio microscópico, se siguió la misma sistemática:

- Inclusión en Hematoxilina-eosina.
- En las lesiones colónicas, se realizaron técnicas histoquímicas para el estudio de mucinas, como la tinción con azul alciano (AA) a pH 2,5.
- En los pólipos y muestras recogidas de otros órganos no se utilizaron técnicas especiales.

La técnica empleada para la tinción con AA comprendió distintas fases;

- Los cortes histológicos de 4 micras de espesor se introdujeron en estufa de 37º para desparafinar la muestra.
- Estos cortes histológicos se pasaron a dos xiloles consecutivos durante 10 minutos cada uno.
- Se pasan a continuación a alcoholes decrecientes y finalmente por agua destilada.
- Se aplicó el colorante Azul Alciano (AA) a pH 2.5 durante 10 mn.
- Se lavó de nuevo con agua destilada
- Se montaron y cubrieron.

Los cortes histológicos se estudiaron con un microscopio Zeiss, y se contabilizaron para su posterior evaluación.

## **2.6. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.**

Todos los datos obtenidos fueron introducidos en hoja de cálculo de Microsoft Excel, para su procesamiento ulterior. El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS Win V 12.0

La comparación de estadística de las variables cuantitativas se ha utilizado el Test de Anova.

Para comparar las variables cualitativas se ha utilizado el Test de la Chi cuadrado , con la corrección de Yates en las tablas de 2x2, y el Test de Fisher en el caso de frecuencias pequeñas.

El nivel de significación estadística establecido fue del 0,05.

# RESULTADOS

---

## **1.- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS.**

En este apartado, se recogen los resultados del estudio de las muestras obtenidas, pólipos y tumores, así como el estadiaje según la clasificación clásica de Dukes:

Estadio A: lesión limitada a la mucosa, sin afectación ganglionar.

Estadio B1: el tumor afecta a parte de la pared del colon o recto, sin atravesarla ni afectar ganglios.

Estadio B2: afecta a toda la pared sin invasión ganglionar.

Estadio C: la enfermedad puede afectar a parte o a toda la pared, con afectación ganglionar.

Estadio D: existe afectación de otros órganos alejados.

Como ya se ha explicado anteriormente, cada animal se clasifica según un número ordinal que se le asigna a cada rata, seguido de las letras H o M, según sean Hembras o Machos, y por último otro número que sería el del grupo al que pertenecen.

A continuación se detalla la relación de animales y sus estudios anatomopatológicos.

## **Grupo 1**

A estos animales se les administra Rofecoxib desde el día 1 (1ª semana) hasta el final (semana 52).

Llegan al final del estudio 17 ratas (8 machos y 9 hembras) de las cuales se obtuvieron 22 muestras.

### **HEMBRAS:**

#### **1-H-1:**

2 muestras:

- Hemangioma hepático
- Tumor de 0'3 cm. Adenocarcinoma invasivo mucosecretor coloide. (B Dukes)

#### **2-H-1:**

2 Muestras:

- Tumor renal. Quistes uriníferos
- Tumor de 0'3 cm. Adenocarcinoma invasivo (B Dukes) (Figura 5)
- 2 pólipos adenomatosos de 0'3 y 0'2 cm.

#### **3-H-1:**

1 muestra:

- 3 tumores de 0'2, 0'2 y 0'4 cm. Adenocarcinoma invasivo. (B Dukes)

#### **4-H-1:**

1 muestra:

- Pólipo adenomatoso de 0'2 cm. (Figura 8)

**5-H-1:**

1 muestra: normal.

**6-H-1:**

1 muestra: normal.

**7-H-1:**

1 muestra: normal.

**8-H-1:**

1 muestra:

-Tumor de 0'5 cm. Adenocarcinoma invasivo tubular (C Dukes).

**9-H-1:**

1 muestra:

-2 pólipos adenomatosos de 0'3 cm.

**MACHOS:**

**10-M-1:**

1 muestras:

- 3 tumores de 0'3, 0'3 y 0'5 cm. Adenocarcinoma invasivo tubular. (C de Dukes)

**11-M-1:**

2 muestras:

- Quiste de inclusión epidérmica en cuello
- 3 tumores de 0'5, 0'3 y 0'3 cm. Adenocarcinoma invasivo tubular (C de Dukes) y adenocarcinoma plano músculo invasivo (C Dukes).

**12-M-1:**

1 muestra:

- 4 pólipos adenomatosos (2 de alto grado y 2 con infiltrado linfoide) de 0'2, 0'4, 0'3 y 0'3 cm.

**13-M-1:**

2 muestras:

- Normal.
- 3 tumores de 0'3 cm. cada uno. Adenocarcinomas invasivos. (B de Dukes).

**14M1:**

2 muestras:

- Hiperplasia folicular linfoide
- 6 pólipos adenomatosos, 4 con infiltración linfoide, de 0'6, 0'4, 0'3, 0'3, 0'2 y 0'2



**15-M-1:**

1 muestra:

- Tumor de 0'4 cm. Adenocarcinoma invasivo (B Dukes). (Figura 2)
- Pólipo adenomatoso de 0'2 cm.

**16-M-1:**

1 muestra:

- 2 pólipos adenomatosos de 0'4 y 0'5 cm.

**17-M-1:**

1 muestra:

- 2 tumores de 0'5 y 0'6 cm. Adenocarcinoma invasivo. (B de Dukes)
- 1 Pólipo adenomatoso de 0'4 cm.

## **Grupo 2**

Inician el estudio, al igual que los grupos 1 y 3, 13 machos y 13 hembras.

Administración de Rofecoxib desde la semana 7ª hasta la semana 52

Llegan al final del estudio 11 ratas (6 machos y 5 hembras) de las cuales se obtienen 15 muestras.

### **MACHOS:**

#### **18-M-2:**

2 muestras:

1 -Tumoración de 4 cm. Adenocarcinoma invasivo tubular (C de Dukes) (Figura 3)

2 -3 pólipos adenomatosos de 0'5 cm. cada uno.

#### **19-M-2:**

1 muestra:

-Tumoración de 0'5 cm. Adenocarcinoma polipoide músculo invasivo (C de Dukes)

#### **20-M-2:**

1 muestra:

-Tumoración de 0'5 cm. Adenocarcinoma polipoide. (A de Dukes) (Figura 1)

**21-M-2:**

1 muestra:

-Tumoración de 3 cm. Adenocarcinoma invasivo. (B de Dukes)

**22-M-2:**

2 muestras:

1 –Pólipo adenomatoso de 0'3 cm.

2 –Tumoración de 0'8 cm. Adenocarcinoma invasivo. (B de Dukes)

**23-M-2:**

1 muestra

- Tumor de 4 cm en colon. Carcinoma invasivo papilar. (C Dukes)

**HEMBRAS:**

**24-H-2:**

1 muestra

-Pólipo adenomatoso de 0'2 cm.

**25-H-2:**

1 muestra: normal.

**26-H-2:**

1 muestra: normal.

**27-H-2:**

2 muestras:

1 –Pólipo adenomatoso de alto grado de 0'5 cm.

2 –Tumoración de 0'2 cm. Tejido de granulación y adenocarcinoma invasivo. (B de Dukes)

**28-H-2:**

3 muestras:

1 –Tejido hepático, dilatación de conductos biliares y congestión vascular.

2 –Tumoración de 0'8 cm. Adenocarcinoma invasivo. (B de Dukes)

3 –Tumoración de 4 cm. Adenocarcinoma invasivo tubular. (C de Dukes)

### **GRUPO 3.**

Inician el estudio, al igual que los grupos 1 y 2, 13 machos y 13 hembras.

Se les administra Azoximetano en las semanas 7, 9 y 10.

Llegan al final del estudio 16 ratas (6 machos y 10 hembras) de las cuales se obtienen 18 muestras.

#### **29-M-3:**

Dos muestras.

- Carcinoma coloide invasivo colon. Metaplasia ósea. (C de Dukes)
- Tumoración intestino delgado. Ectasia vascular

#### **30-M-3:**

Una muestra. Tumoración 0,2 cm

Adenocarcinoma polipoide invasivo. Metástasis Hepáticas (D de Dukes)  
(Figura 9)

#### **31-M-3:**

Una muestra.

Pólipo adenomatoso, de 0,6 cm, con atipia de alto grado.

**32-M-3:**

Una muestra. Tumoración de 0,7 cm.

Adenocarcinoma invasivo tubular con áreas coloides y en anillo de sello.

Metástasis Hepáticas (D de Dukes).

**33-M-3:**

Una muestra. Tres tumores polipoides de unos 0,6 cm.

Adenocarcinoma invasivo con áreas coloides y en anillo de sello.

Metástasis hepáticas (D de Dukes).

**34-M-3:**

Una muestra. Dos tumoraciones en colon, la mayor de 0,8 cm.

Adenocarcinoma invasivo. Metástasis Hepáticas (D de Dukes)

**35-H-3:**

Una muestra. Tumor de colon de 0,5 cm.

Adenocarcinoma invasivo. Metástasis Hepáticas (D de Dukes)

**36-H-3:**

Una muestra.

Pólipo adenomatoso, 0,9 cm.

### **37-H-3:**

Dos muestra. Dos tumores, uno de 0,4 cm.

- Adenocarcinoma tubular invasivo. Metástasis Hepáticas. (D de Dukes). (Figura 9)
- Adenocarcinoma polipoide no invasivo. Metástasis Ganglionares (C de Dukes)

### **38-H-3:**

Una muestra. Pólipo adenomatoso de 0,9 cm.

### **39-H-3:**

Una muestra.

- Tumor en colon de 0,4 cm. Adenocarcinoma polipoide no invasivo con Metástasis Ganglionares (C de Dukes) (Figuras 7 y 10)
- Pólipo adenomatoso de 0,8 cm. (Figura 11)

### **40-H-3:**

Una muestra. Dos tumores en colon, el mayor de 0,7 cm. Metástasis Hepáticas.

Adenocarcinoma invasivo. (D de Dukes)

### **41-H-3:**

Una muestra. Dos tumoraciones en colon de 0,6 cm y 0,8cm.

Adenocarcinoma polipoide invasivo y. Metástasis Ganglionares. (C de Dukes)

**42-H-3:**

Una muestra. Varias tumoraciones en colon.  
Hiperplasias linfoides sin lesiones neoplásicas.

**43-H-3:**

Una muestra. Dos tumoraciones de 0,6 cm.  
Adenocarcinoma polipoide. Metástasis Ganglionares. (C de Dukes)

**44-H-3:**

Una muestra. Tumor en colon de 1,5 cm.  
Carcinoma invasivo papilar. Metástasis Hepáticas (D de Dukes)

**GRUPO CONTROL , GRUPO 4.**

A estos animales no les administró ningún fármaco.  
Al final del estudio, sobrevivieron 9.  
Muestras de la **45-C** a **53-C**, todas ellas sin alteraciones.



## Valoración de los Grados de Dukes obtenidos:

En las siguientes Tabla y gráfico se recogen y analizan los distintos grados de Dukes por grupo y por sexo. (Tabla 11, Gráfico 1).

		<b>DUKES A</b>	<b>DUKES B</b>	<b>DUKES C</b>	<b>DUKES D</b>
<b>GRUPO 1</b>	Machos	0 0%	5 45,45%	6 54,54%	0 0%
	Hembras	0 0%	3 75%	1 25%	0 0%
	Total Grupo 1	0 0%	8 53,33%	7 46,66%	0 0%
<b>GRUPO 2</b>	Machos	1 16,66%	2 33,33%	3 50%	0
	Hembras	0	2 66,6%	1 33,3%	0
	Total Grupo 2	1 11,11%	4 44,44%	4 44,44%	0 0%
<b>GRUPO 3</b>	Machos	0 0%	0 0%	1 12,5%	7 87,5%
	Hembras	0 0%	0 0%	8 42,8%	5 57,1%
	Total Grupo 3	0 0%	0 0%	9 42,85%	12 57,14%

Tabla 14 - *Porcentaje de Grados de Dukes por Grupo y sexo.*

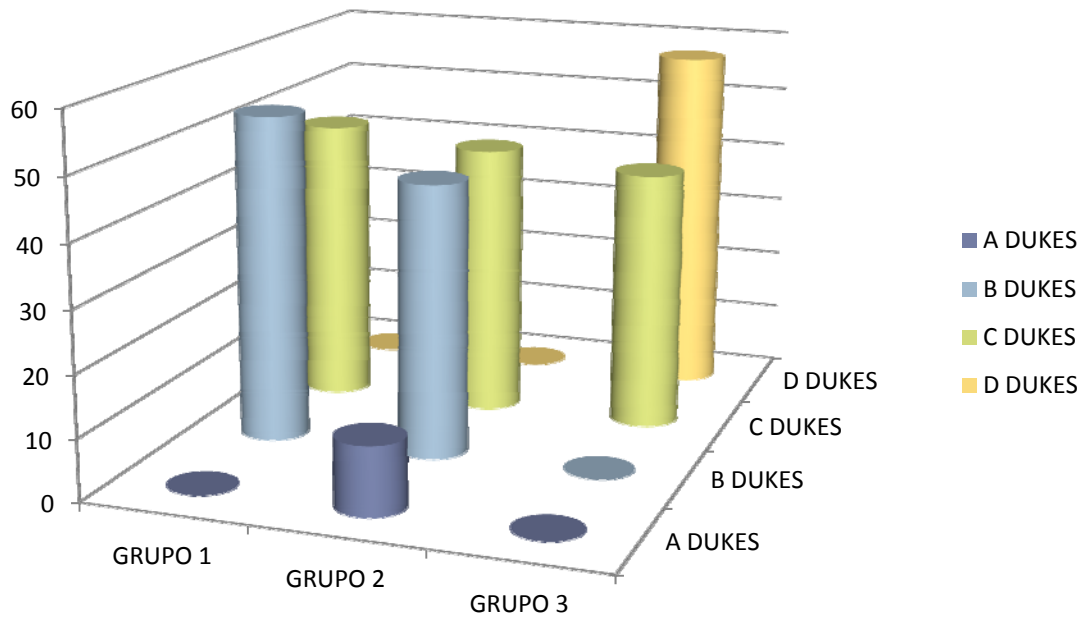


Gráfico 1 – Número tumores por Estadios de Dukes en los tres grupos.

A continuación se exponen algunas imágenes del estudio anatomopatológico macroscópico y microscópico.

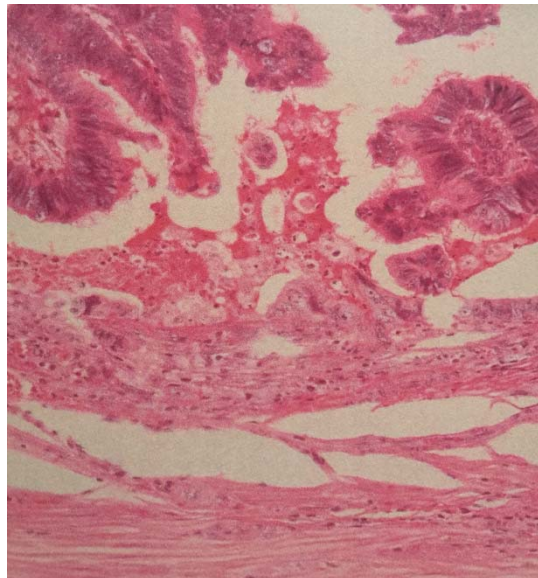


Figura 1 – Adenocarcinoma polipoides Grado A de Dukes. Formación de papilas que infiltran la muscular propia. (HE, 400x)

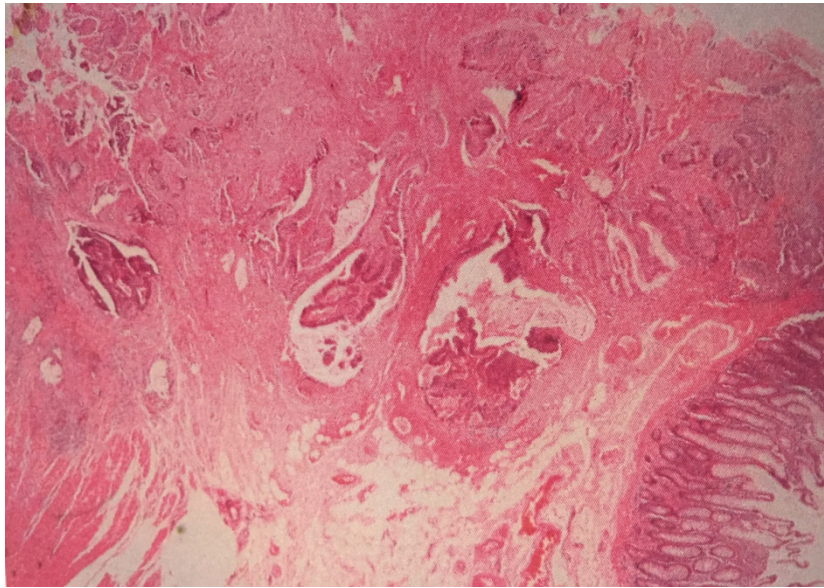


Figura 2 – Adenocarcinoma invasivo grado B de Dukes. (HE, 100x)

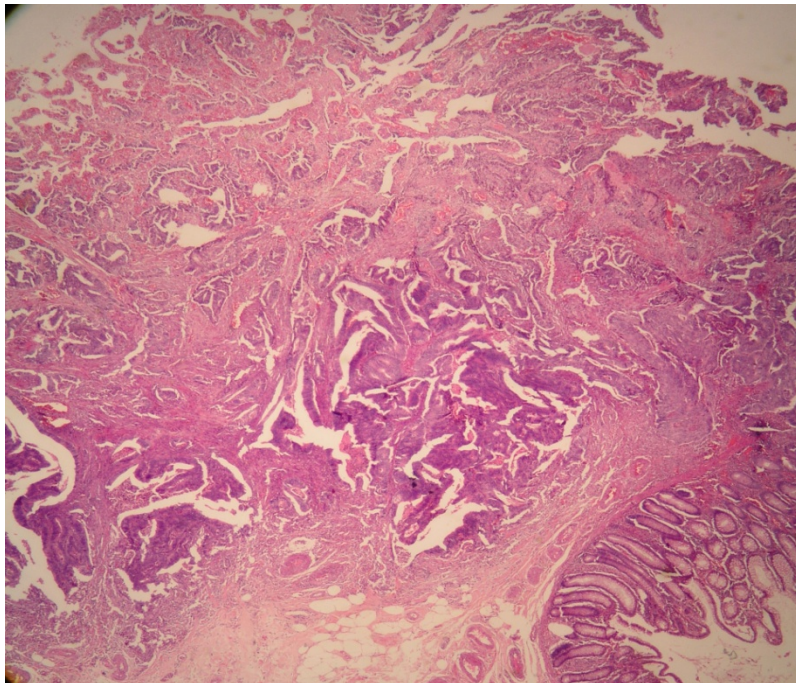


Figura 3 – Adenocarcinoma Estadio C de Dukes (HE, 100x)



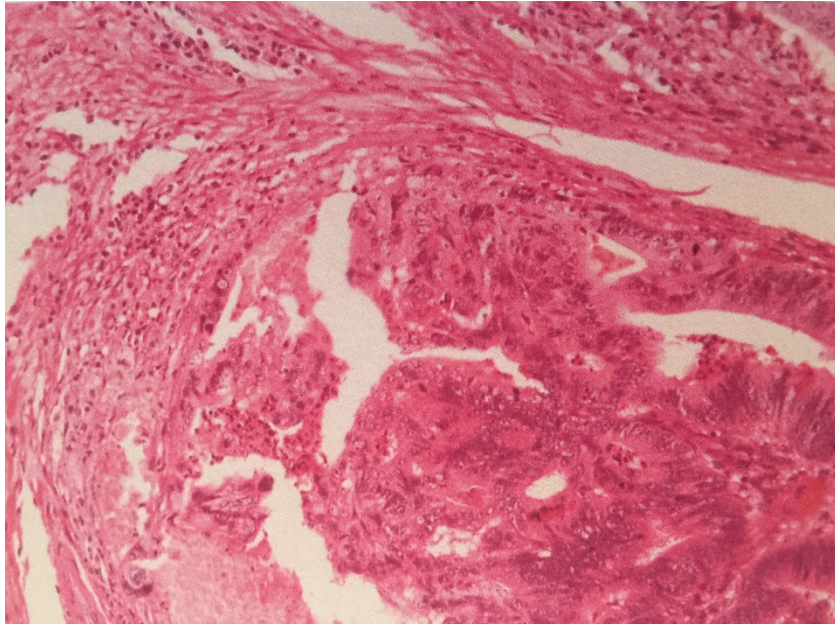


Figura 4 – Adenocarcinoma bien diferenciado expansivo Grado A de Dukes (HE, 400x)

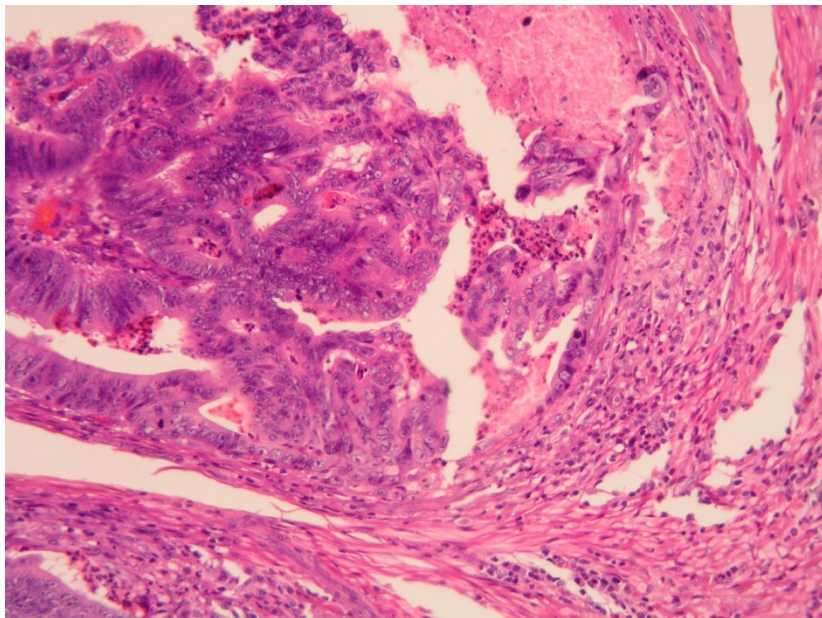


Figura 5 – Borde expansivo de carcinoma invasivo.



Figura 6 – Patrón de crecimiento de carcinoma intestinal. (HE, 400x)

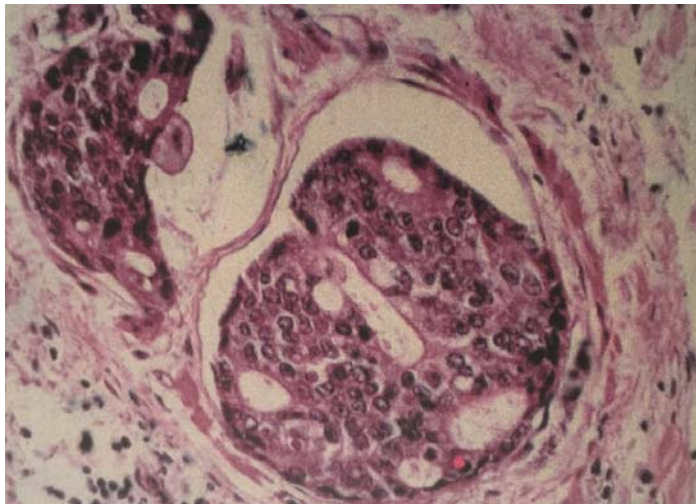


Figura 7 – Invasión linfática (HE, 400x)

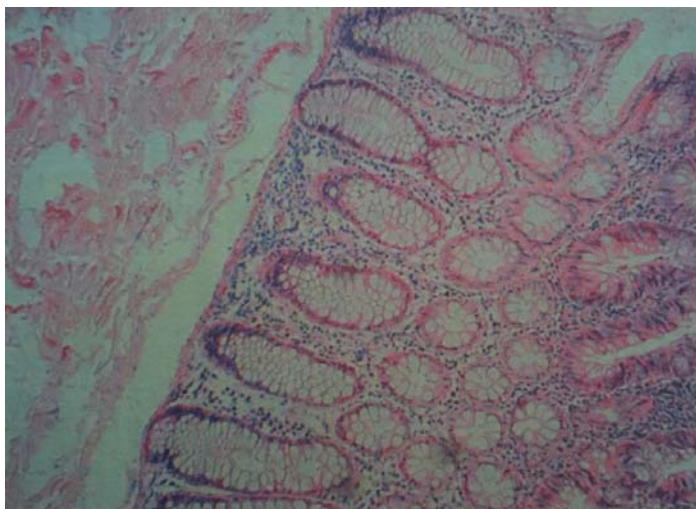


Figura 8 – Pólipo adenomatoso (HE, 140x).



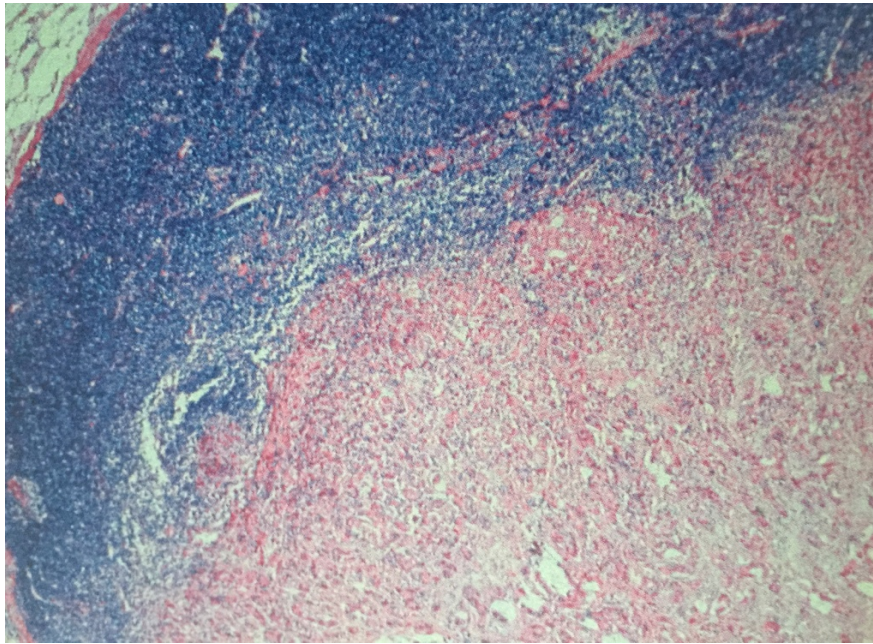


Figura 9 – *Metástasis tumoral (HE; 140x)*

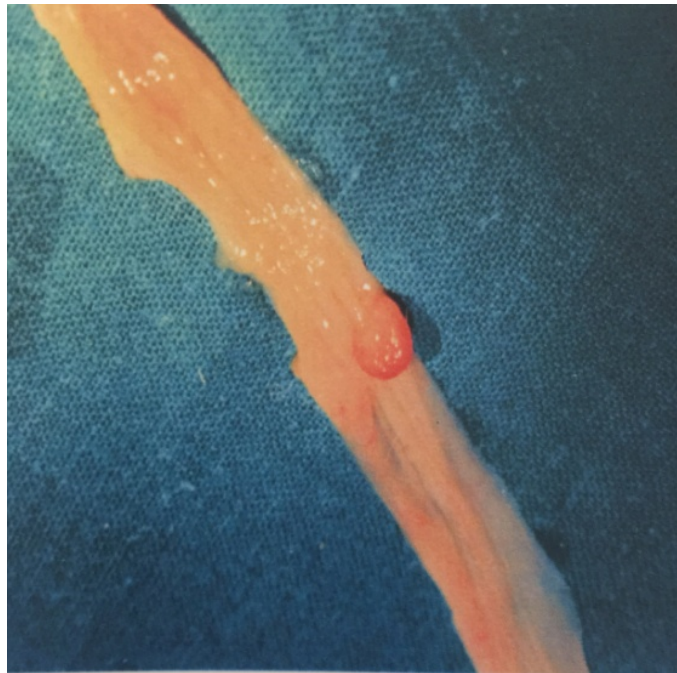
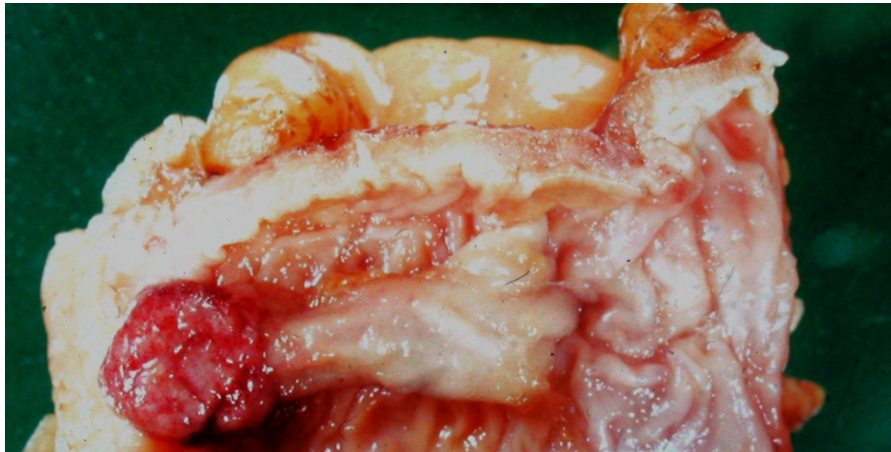


Figura 10 – *Carcinoma Sésil.*



*Figura 11 – Pólipo adenomatoso pediculado.*



*Figura 12 – Tumoración laterocervical.*

## **VALORACIÓN DE LAS PIEZAS DE COLON OBTENIDAS.**

Se observó que los **tumores** que aparecen en el Grupo 3 (administración únicamente de Azoximetano), eran todos estadios C y D de Dukes, es decir, la forma de presentación de la neoplasia más avanzada, y por tanto, inducida por el carcinógeno. (Tabla 12. Gráfico 1 y 2).

El número de tumores también es mayor en el Grupo 3, aunque casi similares a los del Grupo 1, apreciándose que es claramente menor en el Grupo 2.

Microscópicamente, estas lesiones tumorales de naturaleza malignas observadas son de origen epitelial, con una media de tamaño de 0,92 cm., con rango de medidas entre 0,3 y 4 cm.

El patrón de crecimiento más observado ha sido el tubular, en un 70% de los casos, presentando hasta en un 42% de los casos áreas coloides e indiferenciadas en un 11% (Figura 6)

Las lesiones polipoideas previa que se han identificado en un 75% de los casos.

Las lesiones son infiltrativas en el 96% de los casos, sin sobrepasar la muscular propia en un 39% de los tumores. (Figura 5)

En aquellos casos en que existe infiltración de la grasa pericólica (31%) se identificaron a veces reacciones granulomatosas inflamatorias a cuerpo extraño, con moco intraglandular.

La respuesta inflamatoria por el huésped frente al tejido tumoral fue más evidente en aquellos tumores en los que el patrón de crecimiento es expansivo, más que en la mayoría que son infiltrativos.



TUMORES	GRUPO 1				GRUPO 2				GRUPO 3			
	Nº Tumores	Suma tamaños (cm.)	Media De tamaños	Rango de la media	Nº tumores	Suma tamaños (cm.)	Media de tamaños	Rango de la media	Nº Tumores	Suma tamaños (cm)	Media de tamaños	Rango de la media
Machos	12	4'4	0'37	0'2 - 0'6	5	8'8 cm.	1'76	0'5 - 4	8	4,8	0,60	0,2-0,8
Hembras	6	1'9	0'32	0'2 - 0'5	3	5'6	1'87	0'2 - 4	12	7,6	0,63	0,4-1,5
Total	18	6'3	0'35	0'2 - 0'6	8	14'4	1'80	0'2 - 4	20	12,4	0,62	0,2-1,5

Tabla 15 – Registro de tumores observados por grupo.

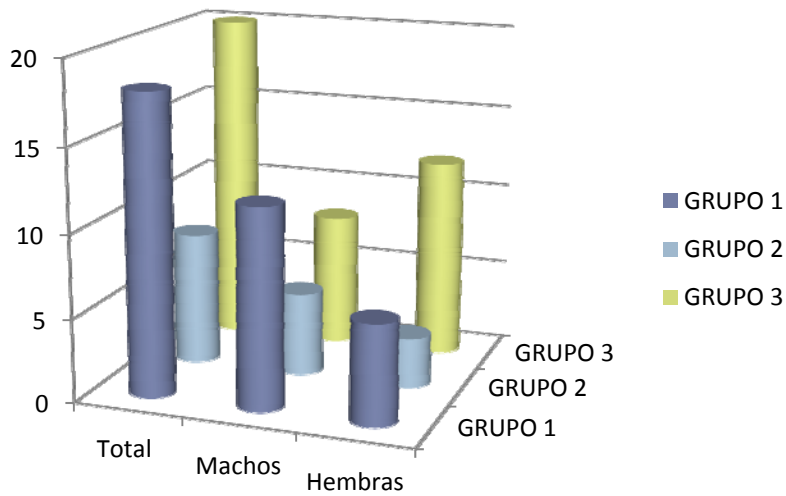


Gráfico 2 – Número de tumores por grupo.

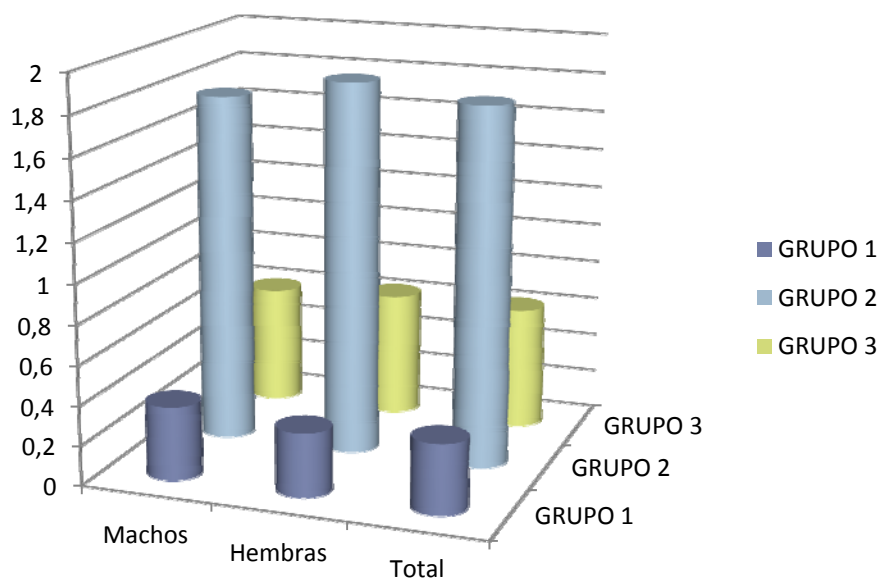


Gráfico 3 – Tamaño de Tumores por grupo.

El número de **tumoraciones extracolónicas** observadas fue muy superior en el Grupo 3. También se observó que fue mayor entre las hembras del Grupo 1, por la apreciación de dos tumores ováricos, un tumor renal y cuatro tumoraciones hepáticas, dos de las cuales fueron tipificadas como Hemangiomas.

La distensión abdominal, como signo de Obstrucción, se observó en mayor proporción en las ratas del Grupo 3, aunque también en tres machos del Grupo 1. (Tabla 13) (Figura 12)

GRUPO	Tumoraciones cervicales		Otras tumoraciones extracolónicas		Distensión abdominal		Úlceras cutaneas	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
1	1			5	3		1	1
2	3	2	1	2				
3		1	10	8	3	2	1	1
TOTAL	4	3	13	15	6	2	2	2

Tabla 16 – Lesiones extracolónicas observadas.

Los **pólipos** que fueron recogidos y estudiados anatomopatológicamente fueron pediculados. (Datos recogidos en la Tabla 14).

En los Adenocarcinomas el aspecto macroscópico era de lesión pediculada y sésil única o múltiple, y aparece con más frecuencia en el Grupo 1

En los grupos 2 y 3 las lesiones más frecuentes fueron úlcero-vegetantes.

En el grupo 3 predominaban los pólipos fungoides, presentando Estadios C y D de Dukes.

Aunque el número de pólipos fue mayor en el Grupo 1, el tamaño de estos fue mayor en el grupo 3 (Gráficos 4 y 5).

PÓLIPOS	GRUPO 1				GRUPO 2				GRUPO 3			
	Nº Pólipos	Suma tamaños (cm.)	Tamaño Medio	Rango de la media	Nº pólipos	Suma tamaños (cm.)	Tamaño medio	Rango de la media	Nº Pólipos	Suma tamaños (cm.)	Tamaño medio	Rango de la media
Machos	13	4'5 cm.	0'35	0'2 - 0'6	4	1'8 cm.	0'45	0'3 - 0'5	1	0,60	0,60	0,60
Hembras	5	1'3 cm.	0'26	0'2 - 0'3	2	0'7 cm.	0'35	0'2 - 0'5	3	2,60	0,86	0,8-0,9
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>5'8 cm.</b>	<b>0'32</b>	<b>0'2 - 0'6</b>	<b>6</b>	<b>2'5 cm.</b>	<b>0'42</b>	<b>0'2 - 0'5</b>	<b>4</b>	<b>3,20</b>	<b>0,80</b>	<b>0,6-0,9</b>

Tabla 17 - Registro de Pólipos observados por grupo.

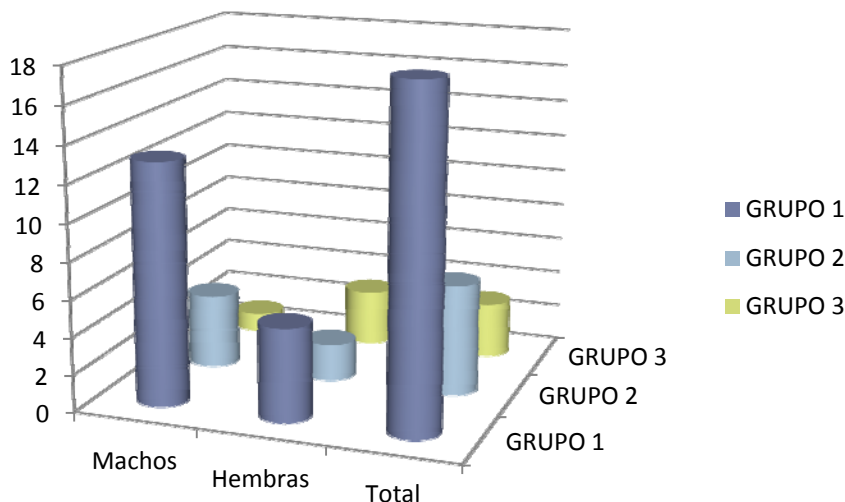


Gráfico 4 – Número de Pólipos según el grupo.

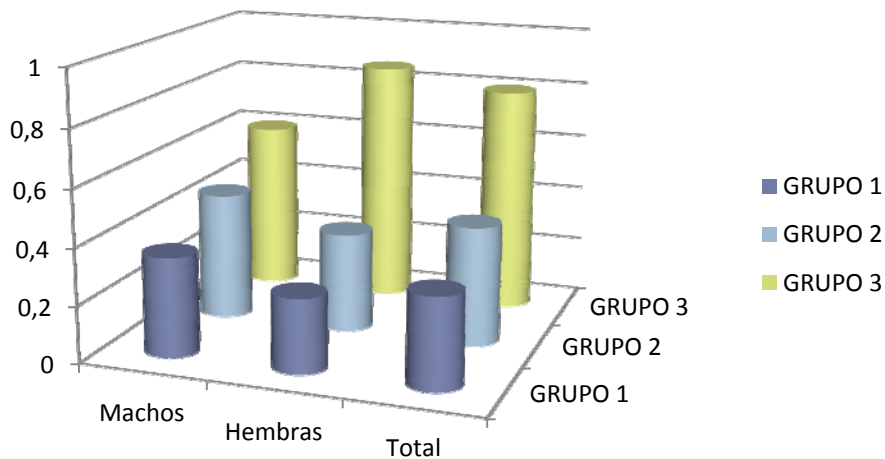


Gráfico 5 – *Tamaño de Pólipos por Grupo.*

En el estudio anatomopatológico microscópico, se observó que los pólipos que tenían más atipias y más severas, siendo estos a su vez de mayor tamaño, pertenecían a las ratas del Grupo 3, que las de los otros dos grupos en los que se administró el Rofecoxib. (Tabla 14).

Dos tipos de pólipos fueron identificados: sésiles o pediculados. Los pediculados tuvieron un tamaño entre 0,3 y 0,9 cm, con un patrón de crecimiento tubular, y áreas de displasia de alto grado más frecuentes que las de bajo grado.

En los pólipos sésiles, con tamaño de entre 0,4 y 0,9 cm, el patrón de crecimiento fue veloadenomatoso, también con áreas de displasia de alto grado más frecuentemente.

En ninguno de ellos, se apreció invasión del tejido conectivo vascular ni de su base.

La mucosa cólica adyacente a estas lesiones polipoideas mostraron cambios moderados de proliferación celular, y en pocos casos, cambios quísticos en algunas de las estructuras glandulares.

Estos datos histológicos, parecen apoyar que el Rofecoxib retarda el proceso o progresión neoplásica a las dosis administradas y en estos animales de experimentación.

## 2. – RESULTADOS ESTADÍSTICOS.

Se han analizado estadísticamente los siguientes parámetros:

- Mortalidad.
- Número de pólipos.
- Número de tumores.
- Grados de Dukes de los tumores.

### 2.1. MORTALIDAD.

La mortalidad de los animales en el estudio, como ya se ha dicho, fue bastante alta, siendo escasa en la primera mitad del estudio y acentuándose a partir de la semana 26. De los 88 animales que iniciaron el estudio, sobrevivieron 53 animales (60,22%) y fallecieron 35, lo que supone una mortalidad total de 39,77%. De estos fueron 14 hembras (40 %) y 21 machos (60 %).

La mortalidad por grupos y semanas fue registrada de la siguiente forma:

- **Grupo 1** – En la semana 52, se contabilizaron 9 animales muertos de los 26 que iniciaron el estudio, lo que supone una mortalidad en este grupo de 34,61%, de los cuales, 5 fueron machos (38,46%) y 4 hembras (30,76%). (Tabla 15) Respecto al estudio de forma global, este grupo presenta una mortalidad 10,23%, 11,36% de machos y 9,10% de hembras. (Tabla 18).

Semana	Machos	Hembras	Muertes totales
31	2		2
39	1		1
40		2	2
41	1		1
42	1		1
45		1	1
48		1	1
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>9</b>

Tabla 18 – Número muertes por semana en Grupo 1.

- **Grupo 2** – Murieron un total de 15 animales, es decir, una mortalidad en este grupo de 57,69%, de los cuales, 8 fueron machos y 7 hembras (mortalidad de 61,54% y 53,84%, respectivamente). (Tabla 16)

La mortalidad de este grupo respecto a la totalidad del estudio fue de 17,04%, siendo para los machos de 18,18% y 15,91%. (Tabla 18).

Semana	Machos	Hembras	Muertes totales
12		1	1
29	1		1
39	2		2
42		1	1
45	2	2	4
48	2	1	3
49	1	1	2
50	8	7	15

Tabla 19 – Número muertes por semana en Grupo 2.

- **Grupo 3** - Se registraron 10 muertes en los 26 animales del grupo (38,46%), de estos 3 fueron hembras (23,07%) y 7 machos (53,84%). (Tabla 17).

Con respecto al total de grupos, la mortalidad en el grupo 3 representó el 11,36%, 7,95% de machos y 3,41% de hembras (Tabla 18).

Semana	Machos	Hembras	Muertes totales
35	1	1	2
42	1		1
43	1		1
45		1	1
46	1		1
48	2		2
50	1	1	2
<b>Totales</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>10</b>

Tabla 20 – Número muertes por semana en Grupo 3.

- **Grupo 4** - Sobrevivieron 9 animales de los 10 que iniciaron el estudio, 5 machos y 5 hembras, que formaban el grupo control. La muerte del macho que se produjo en la semana 40 tuvo que ver con una malformación en los incisivos que le impedía comer, por lo que la mortalidad de este grupo puede considerarse nula. El resto de los animales completó el estudio hasta la semana 52



		Animales al inicio	Fallecimientos machos	Fallecimientos hembras	Fallecimientos totales
<b>GRUPO 1</b>	Nº	26	5	4	9
	% de grupo	100%	38,46%	30,76%	34,61%
	% del total	29,54%	11,36%	9,10%	10,23%
<b>GRUPO 2</b>	Nº	26	8	7	15
	% de grupo	100%	61,54%	53,84%	57,69%
	% del total	29,54%	18,18%	15,91%	17,04%
<b>GRUPO 3</b>	Nº	26	7	3	10
	% de grupo	100%	53,84%	23,07%	38,46%
	% del total	29,54%	15,91%	6,82%	11,36%
<b>GRUPO 4</b>	Nº	10	1	0	1
	% de grupo	100%	20%	0%	10%
	% del total	11,36%	2,27%	0%	1,14%
<b>TOTALES</b>	Nº	88	21	14	35
	%	100%	47,73%	31,81%	39,77%

Tabla 21 - *Mortalidad del estudio.*

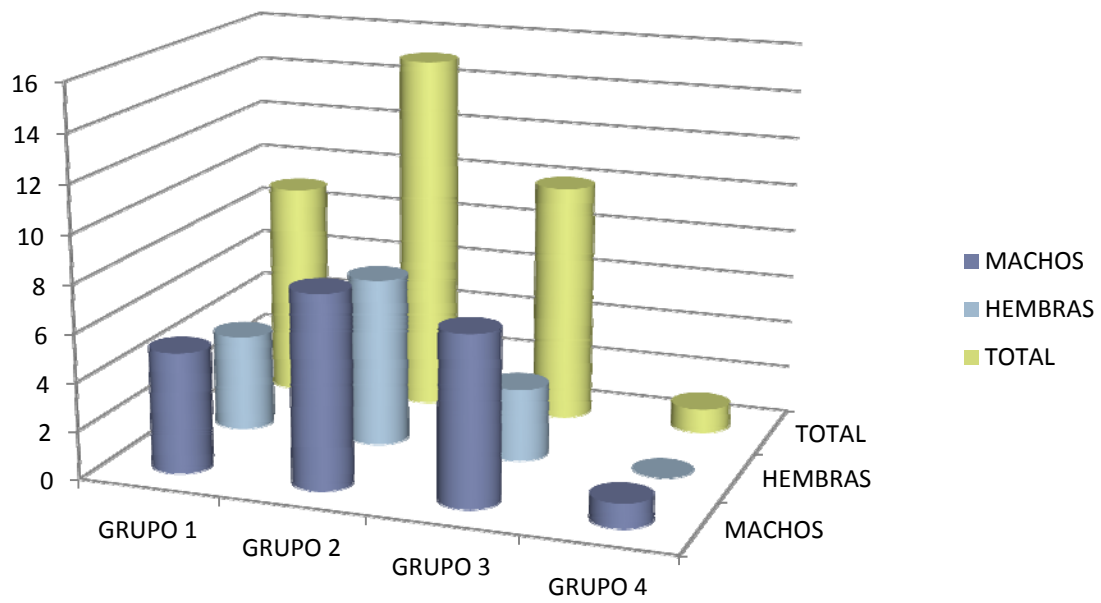


Gráfico 6 – Mortalidad por Grupo y sexos

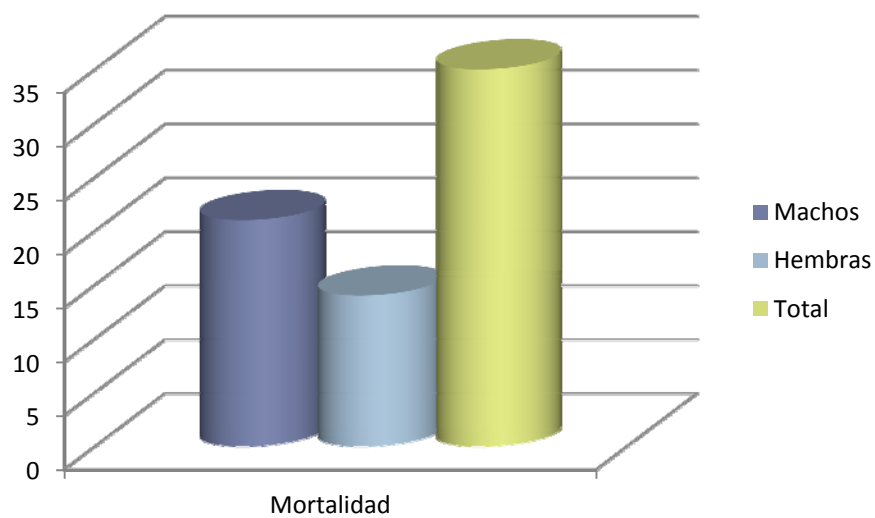


Gráfico 7 – Mortalidad por sexos.

La mortalidad entre aquellos que recibieron Rofecoxib (es decir uniendo los datos de los grupos 1 y 2) fue de 46,15%, y en el grupo 3 (solo recibió Azoximetano) fue de 19,23%.

Al analizar la mortalidad de los cuatro grupos, no se ha obtenido significación estadística,  $p=0,268$ , con un nivel de significación que se ha establecido menor de 0,05.

Excluyendo del análisis al grupo 4, analizando solo a los grupos 1,2, y 3, tampoco se obtiene una mortalidad significativa, siendo  $p=0,859$ .

Si cruzamos los datos de los grupos 1 y 2 ( a los que se administró Rofecoxib desde las semanas 1 y 7 del estudio) considerando a estos un solo grupo frente al grupo 3 ( que sólo recibió Azoximetano) de nuevo no obtenemos significación estadística,  $p=0,846$ .

Por el contrario, al comparar los datos del grupo 3, con una mortalidad durante el estudio de 38,5%, con los del grupo 4 (control, sin administración de fármacos), y una mortalidad del 10%, si obtenemos una  $p$  estadísticamente significativa,  $p=0,021$ .

## **2.2 – NÚMERO y TAMAÑO DE PÓLIPOS.**

El número de pólipos encontrados en los distintos grupos ha sido variable. En el grupo 4, el control, no se encontró ninguno. En el grupo 1, encontramos 18 pólipos, en el grupo 2 sólo 6 y en el grupo 3, 4 pólipos.

Al analizar los datos del grupo 1 frente al 3, encontramos una  $p=0,0048$  y en el grupo 2 frente al 3, encontramos una  $p=0,288$ .

Analizando el tamaño de los pólipos no se encuentra diferencias significativas considerando sólo los grupos 1, 2 y 3, donde la  $p=0,479$ .

Al considerar juntos datos de los grupos 1 y 2 como un solo grupo, frente al grupo 3, encontramos que no existe diferencia estadística respecto al número ( $p=0,915$ ), pero si la hay respecto al tamaño de los mismos ( $p=0,0171$ ).

El mayor número de pólipos ha aparecido en el grupo 1 (18 pólipos) con un tamaño medio de 0,32 cm, mientras que en el grupo 3 se encontraron 4 pólipos con un tamaño medio de 0,8 cm. Al cruzar estos datos, obtenemos significaciones estadísticas, con una  $p=0,054$  y  $p=0,0171$  respectivamente, si consideramos también al grupo 4 donde no se observó ningún pólipo.

Al cruzar los datos del grupo 3 (4 pólipos) con el grupo control (grupo 4) y del grupo 2 con el grupo control, no se obtiene significación estadística,  $p=0,112$  y  $p=0,266$  respectivamente.

### **2.3 – NUMERO Y TAMAÑO DE TUMORES.**

Al analizar la existencia de tumores en los cuatro grupos, se aprecia que el mayor número de estos se encuentra en el Grupo 3 (20 tumores), apareciendo 18 en el grupo 1 y 8 en el grupo 2, siendo nula su presencia en el grupo 4. Obtenemos una  $p= 0,0119$ , estadísticamente significativa.

Si se excluye al grupo 4 de este análisis, por el contrario, obtenemos una  $p=0,473$ , sin diferencia significativa en cuanto a la presencia de tumores.

Se analizaron también los datos de los grupos 1 y 2 conjuntamente frente a los del grupo 3, y tanto en tamaño como en número, no han existido diferencias significativas,  $p= 0,968$  y  $p= 0,296$ , respectivamente.

Por el contrario, si sólo se analizan los datos del grupo 3 (20 tumores) y grupo 4 (ningún tumor), obtenemos una significación  $p= 0,005$ .

De igual forma ocurre con la presencia de tumores del grupo 2 (8 tumores ) con respecto al grupo 4,  $p= 0,008$ , y con la presencia de tumores en el grupo 1 frente al grupo 4,  $p= 0,0078$ .

## **2.4. GRADOS DE DUKES EN LOS TUMORES.**

Como ya se ha explicado anteriormente, en el grupo 4 no aparecieron tumores, siendo el grupo 3 donde aparecen los tumores con estadios más avanzados, 42,85% Grado C de Dukes y 57,14% Grado D de Dukes.

En los grupos 1 y 2 el mayor porcentaje de los tumores eran estadios B y C de Dukes,  $p= 0,015$ .

Al considerar a los grupos 1 y 2 como un solo grupo tratado con Rofecoxib, frente al grupo que solo recibió Azoximetano, grupo 3, comprobamos que el mayor número de tumores siguen siendo estadios B y C, mientras que en el grupo 3, no hay ninguno con gradación A o B, siendo todos grados C y D,  $p=0,005$ . (Tabla 11)

## **2.5. PRESENCIA DE METÁSTASIS.**

El número de tumoraciones extracolónicas observadas fue muy superior en el Grupo 3, hasta en un número de 18, lo que supone un 69,2 % de los animales del grupo 3.

# DISCUSIÓN.

---

Hace casi dos décadas, Vogelstein et al. propusieron un modelo molecular y genético en la tumorigénesis del colon<sup>(10)</sup>. Este paradigma marcó el comienzo de una explosión de investigaciones sobre la genética molecular y la biología del cáncer de colon. Ahora se entiende mucho mejor la patogénesis del cáncer de colon a nivel celular, y esto conllevará el mejor conocimiento sobre las distintas fases y factores, ya que el CCR es un proceso multietapas y multifactorial, en los que se puede actuar para prevenirlo, diagnosticarlo y tratarlo de la forma más precoz y adecuada posible.

Por ello, la quimioprevención definida como la prevención, la inversión o la inhibición de la carcinogénesis antes del desarrollo de cáncer invasivo mediante el uso de agentes químicos, está tomando mucha importancia en las investigaciones sobre el CCR desde hace unos años.

Una de las primeras publicaciones en las que aparece una relación entre los AINES y el CCR, fue en un estudio publicado por Kune et al en 1988, donde se aprecia una menor incidencia de CCR en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) que tomaban Sulfasalazina <sup>(121)</sup>.

Poco después, se publica la primera evidencia directa de la modulación de CCR asociadas a AINEs, en estudio con pacientes afectos de PAF en tratamiento con Sundilac <sup>(104)</sup>

El Azoximetano es usado como Carcinógeno en estudios de experimentación sobre CCR. En el nuestro, el grupo 3, 26 ratas que sólo recibieron Azoximetano, fue el que más tumores ha desarrollado, y todos en Estadio C y D de Dukes.

En el grupo 4, el grupo control, que no recibió ningún fármaco, los animales no han desarrollado tumores. Sin embargo, en los otros 3 grupos, en los que se administró Azoximetano, sí que han desarrollado tumores respecto al grupo 4 ( $p=0,007$ ). Es igualmente significativo el resultado analizando el número de tumores de cada grupo respecto al grupo control 4, sólo en los grupos 2 y 3, con  $p= 0,001$  y  $0,005$  respectivamente. La  $p$  en el grupo 1 fue de  $p=0,078$ , por lo que no es significativo.

De igual forma, al analizar los pólipos del grupo 3 (fueron 4 los pólipos analizados), todos ellos tenían atipias de alto grado y eran de mayor tamaño.

Tal como se ha descrito en estudios sobre la carcinogénesis inducida por Azoximetano <sup>(118,119)</sup>, el desarrollo de los tumores se ha producido entre los 5 y 7 meses tras la administración del Azoximetano, coincidiendo con un aumento de la mortalidad en el estudio a partir de la segunda mitad del mismo, y en concreto en el grupo 3 en la semana 35. De forma paradójica, la mortalidad en los grupos 1 y 2 se inicia de forma más precoz, en las semanas 31 y 12 respectivamente.



En los tres grupos la mortalidad de los machos fue mayor que la de las hembras.

No se han encontrado diferencias significativas, sustentándonos en los resultados estadísticos obtenidos, respecto a la quimioprevención con Rofecoxib respecto al número y tamaño de los tumores encontrados, aunque si se puede apreciar un enlentecimiento en la producción y desarrollo de los mismos. Esto, se observa sobre todo y de forma llamativa en el Grupo 2 (8 tumores), donde se inicia la administración de Rofecoxib en la semana 7 del estudio, es decir, cinco semanas después de la administración de la primera dosis de Azoximetano, respecto al grupo 1 (que recibió Rofecoxib desde el inicio del estudio) y en el que se apreciaron 18 tumores. El número de tumores en los grupos 1 y 2, ha sido menor que los hallados en el grupo 3, que fueron 20 tumores.

Sin embargo, y respecto al tamaño de los tumores, los de mayor tamaño fueron encontrados en el grupo 2, donde la media de tamaños fue de 1,8 cm (tres tumores de 4 cm y uno de 3 cm), siendo la media para los grupos 1 y 3 más parecidas entre ellos, 0,35 y 0,62 respectivamente. Esta escasa diferencia pudiera ser por la mayor necrosis en los carcinomas de los grupos 1 y 3, y que se traduce en menor tamaño.

La actividad antiproliferativa del Rofecoxib antes de la actuación del carcinógeno (grupo 1), podría ser insuficiente para impedir la transformación maligna, pero garantiza un enlentecimiento del proceso neoplásico. Lo mismo ocurre en el grupo 2, aunque la administración se inicia posteriormente a la administración del Azoximetano, y la carcinogénesis ya se ha iniciado, retrasa el proceso secuencial hacia el

carcinoma, pudiendo sugerir estos resultados que su acción es más efectiva una vez se ha iniciado el proceso que en la prevención del mismo.

En este estudio, el Rofecoxib podría también estar también relacionado con menor aparición de metástasis, y por tanto con la menor adhesión de células tumorales inhibidas por la COX -2, al inhibir la producción de PG E, de la Interleukina -6 (IL-6) y de la Haptoglobina, relacionadas con la invasión e implantación de células tumorales, angiogénesis, así como en su adhesividad a otros órganos. Observamos que las lesiones metastásicas en este estudio, aunque también aparecen en los grupos 1 y 2, son menos frecuentes que las que aparecen el grupo 3. Concuere da con lo publicado por Tachimori<sup>(117)</sup>, que cree que inhibidores de la COX-2 asociado a otros QT podrían tener efectividad en el tratamiento de las metástasis hepáticas.

En los estadios de Dukes de las tumoraciones, si se han encontrado diferencias significativas entre los tres grupos. En el grupo 3, todos los tumores han sido grados C y D de Dukes (42,85% y 57,14% respectivamente), mientras que en los grupos 1 y 2 los mayores porcentajes se han dado en los estadios B y C.

No ha habido diferencias significativas entre los grupos 1 y 2, por lo que la administración de Rofecoxib antes o después del carcinógeno no influye en la malignidad del tumor, aunque sí parece influir en el efecto enlentecedor de la progresión tumoral, tardando más en evolucionar a

estadios más avanzados, y encontrando que es mayor este efecto en la administración posterior al carcinógeno.

Según estos resultados, creemos que le Rofecoxib podría aportar efecto beneficiosos en el desarrollo del carcinoma Colorrectal, como se demuestra en muchos estudios <sup>(111,115,120,124,125,126)</sup>. Aunque al igual que Reddy <sup>(127)</sup> y Fujimura <sup>(122)</sup> creemos que ejercería su acción impidiendo la evolución a fases más avanzadas y no tanto sobre el inicio del proceso tumoral.

La mayoría de los adenocarcinomas observados en los grupos 1 y 2 son lesiones sésiles (75%) y en menos del 10% son lesiones fungoides, que aparecieron en un 20% en el grupo 2.

Esto podría relacionarse con una disminución de la proliferación y agresividad tumoral cuando se administra Rofecoxib antes del inicio de la actividad del carcinógeno que si se administra tras el carcinógeno.

Al igual que Fujimura <sup>(123)</sup> y Gupta <sup>(128)</sup>, consideramos que los inhibidores de la COX-2, o en su caso derivados de esta, como propone Bocca <sup>(129)</sup> podrían ser útiles como profilaxis, ya que la inhibición de la COX-2 sería la responsable del efecto antitumoral, al encontrarse que está sobreexpresada en el tejido displásico y neoplásico (aunque ciertamente no en todos los cánceres de colon) , esta sobreexpresión sería la responsable de la inducción de la angiogénesis e inhibición de la apoptosis de las células displásicas, induciendo así el desarrollo del tumor.

En nuestro estudio, el número de los pólipos encontrados cruzando los datos del grupo 1 y 2 por separado con el grupo 3, ha sido significativo para el grupo 1 ( $p=0,0048$ ).

Al considerar juntos los grupos 1 y 2 como un solo grupo, frente al grupo 3, encontramos que no existen diferencias estadísticas respecto al número ( $p=0,915$ ), pero si la hay respecto al tamaño de los mismos ( $p=0,0171$ ).

El mayor número de pólipos ha aparecido en el grupo 1 (18 pólipos) con un tamaño medio de 0,32 cm, mientras que en el grupo 3 se encontraron 4 pólipos con un tamaño medio de 0,8 cm. Al cruzar estos datos, obtenemos significaciones estadísticas, con una  $p=0,054$  y  $p=0,0171$  respectivamente, si consideramos también al grupo 4 donde no se observó ningún pólipo.

Estos datos de nuevo apoyarían la teoría de que el Rofecoxib administrado antes del carcinógeno, al inhibir a la COX-2, impediría el desarrollo de la neoplasia.

En la actualidad el desarrollo de fármacos antineoplásicos están encaminados al hallazgo de moléculas dirigidas a señales celulares, que eviten el desarrollo o evolución de aquellas células en el tumor que son las causantes de la progresión tumoral. Bloqueando el desarrollo o incluso eliminando únicamente estas líneas celulares se podría conseguir un agente quimioprofiláctico y quimioterápico a la vez.

# CONCLUSIONES.

---

- 1- El estudio de la mortalidad no muestra diferencias que sustenten que la administración de Rofecoxib, como quimioprofilaxis, aumente la supervivencia.
- 2- La mortalidad es mayor entre los machos, y tampoco se ve influida por la administración o no de Rofecoxib.
- 3- Todos los animales del grupo 3 desarrollaron algún tipo de tumoración. Queda pues demostrada la utilidad del Azoximetano como carcinógeno en estudios experimentales, y en concreto en este estudio.
- 4- Los datos anatomopatológicos muestran diferencias que apoyan la presunción del efecto quimiopreventivo del Rofecoxib.
- 5- La administración de Rofecoxib después de la acción del carcinógeno inhibe la progresión tumoral, lo que también sustenta su acción como quimioprofiláctica.
- 6- El tratamiento con Rofecoxib una vez se ha iniciado el proceso tumoral (inducido por Azoximetano) puede impedir la progresión a estadios más avanzados.

- 7- Se puede afirmar que el Rofecoxib enlentece la progresión tumoral, independientemente de su administración antes o después del carcinógeno, según los datos obtenidos de la estadificación tumoral según la clasificación de Dukes en los distintos grupos.
  
- 8- La administración de Rofecoxib en la inducción tumoral por Azoximetano, enlentece el proceso neoplásico, basándonos en el estudio del número de pólipos.
  
- 9- El número de nódulos metastásicos ha sido inferior en los grupos tratados con Rofecoxib (grupos 1 y 2).  
Esto apoyaría la teoría de una menor capacidad adhesividad de las células tumorales inducido por la inhibición de la COX-2.

## REFERENCIAS.

---

1. "Global cancer statistics, 2012". Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal ACA *Cancer J Clin.* 2015;65(2):87.
2. "Cancer statistics, 2015". Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer J Clin.* 2015;65(1):5
3. "The changing distribution of large intestinal cancer". Mamazza J, Gordon PH. *Dis Colon Rectum.* 1982; 25(6):558.
4. "Increasing incidence of cecal and sigmoid carcinoma". Data from the Connecticut Tumor Registry. Vukasin AP, Ballantyne GH, Flannery JT, Lerner E, Modlin IM. *Cancer.* 1990; 66(11):2442.
5. Potter J, Slattery M, Bostick R, et al. "Colon cancer: a review of the epidemiology". *Epidemiol. Rev.*, 15 (1993) 499–535.
6. Correa P and Haenszel W. "The epidemiology of large bowel cancer". *Adv. Cancer Res.*, **26** (1978) 1–141.

7. Hill M, Morson B, and Bussey H. Aetiology of adenoma–carcinoma sequence in large bowel.
8. Shiller M<sup>1</sup>, Boostrom S<sup>2</sup>. “The molecular basis of rectal cancer”. *Clin Colon Rectal Surg.* 2015 Mar; 28(1):53-60. doi: 10.1055/s-0035-1545070.
9. Janjua HG<sup>1</sup>, Høgdall E, Linnemann D. *APMIS*. “Hyperplastic polyps of the colon and rectum - reclassification, BRAF and KRAS status in index polyps and subsequent colorectal carcinoma”. 2015 Apr;123(4):298-304. doi: 10.1111/apm.12355. Epub 2015 Feb 23.
10. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. “Genetic alterations during colorectal-tumor development”. *N. Engl. J. Med.*, 319 (1988) 525–532.
11. Colorectal Cancer. Multimodality Management. Leonard B. Saltz, MD. 2002. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY.
12. Kim E and Lance P. Colorectal polyps and their relationship to cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 26 (1997) 1–17.
13. Lane DP. “Cancer. p53, guardian of the genome”. *Nature*, 358 (1992) 15–16.
14. Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, et al. “A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage”. *Nature*, 404 (2000) 42–49.



15. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum. Mol. Genet.*, **1** (1992) 229–233.
16. Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, et al. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90** (1993) 2846–2850.
17. Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, et al. Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell*, **66** (1991) 601–613.
18. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, (1991) 661–665.
19. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, **253** (1991) 665–669.
20. Peifer M. Beta-catenin as oncogene: the smoking gun [comment]. *Science*, **275** (1997) 1752–1753.
21. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat. Cell. Biol.*, **2** (2000) 653–660
22. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, et al. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell*, **87** (1996) 175–185

23. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 247 (1990) 49–56.
24. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, and Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature*, 395 (1998) 801–814.
25. Jiricny J and Nystrom-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10** (2000) 157–161.
26. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite.
27. Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58 (1998) 5248–5257.
28. Sheehan JM, Sheehan K, O'Donoghue DP, et al, “ The relationship between cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer”. *Jama* 1999; 282: 1254-1257.

29. Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, and Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J. Clin. Invest.*, 96 (1995) 491–503.
30. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, and DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 107 (1994) 1183–1188.
31. Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, et al. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 4816–4820.
32. Fukutake M, Nakatsugi S, Isoi T, et al. Suppressing effects of nimesulide, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, **19** (1998) 1939–1942.
33. Yoshimi N, Kawabata K, Hara A, Matsunaga K, Yamada Y, and Mori H. Inhibitory effect of NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in colon carcinogenesis of F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88 (1997) 1044–1051.

34. Smigel K. Arthritis drug approved for polyp prevention blazes trail for other prevention trials [news]. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92 (2000) 297–299
35. Armstrong B and Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer*, **15** (1975) 617–631.
36. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, et al. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res* 2010; 70:2406.
- 37.15. Heilbrun L, Nomura A, Hankin J, and Stemmermann G. Diet and colorectal cancer with special reference to fiber intake. *Int. J. Cancer*, 44 (1989) 1–6.
38. Kato I, Akhmedkhanov A, Koenig K, Toniolo P, Shore R, and Riboli E. Prospective study of diet and female colorectal cancer: the New York University Women's Health Study. *Nutr. Cancer*, 28 (1997) 276–281.
39. Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, and Potter JD. Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study *Am. J. Epidemiol.*, 139 (1994) 1–15.
40. Thun M, Calle E, Namboodiri M, et al. Risk factors for fatal colon cancer in a large prospective study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84 (1992) 1491–1500.

41. Koushik A, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:1471.
42. Lee JE, Chan AT. Fruit, vegetables, and folate: cultivating the evidence for cancer prevention. *Gastroenterology* 2011; 141:16.
43. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375: 1030-47.
44. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology*. 2001;21:198-213.
45. Jass JR. Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann. NY Acad. Sci.*, 910 (2000) 62–73; discussion 73–74.
46. Lynch HT and Lynch JF. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Semin. Surg. Oncol.*, 18 (2000) 305–313.
47. Lynch H, Smyrk T, and Lynch J. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet. Cytogenet.*, 93 (1997) 84–99.

- 48.Lindor NM, Rabe K, Petersen GM. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA*. 2005;293:1979-85.
- 49.Bernstein C, Shanahan F, and Weinstein W. Are we telling the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? *Lancet*, 343 (1994) 71–74. 77. Ekbom A, Helmick C, Zack M, et al. Ulcerative colitis and colorectal cancer: a population-based study. *N. Engl. J. Med.*, 323 (1990) 1228–1233
- 50.Ekbom A, Helmick C, Zack M, et al. Ulcerative colitis and colorectal cancer: a population-based study. *N. Engl. J. Med.*, **323** (1990) 1228–1233
- 51.Choi P, Nugent F, and Rossi R. Relationship between colorectal neoplasia and primary sclerosing cholangitis in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, **103** (1992) 1707–1709.
- 52.D’Haens G, Lashner B, and Hanauer S. Pericholangitis and sclerosing cholangitis are risk factors for dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.*, **88** (1993) 1174–1178.
53. Connell W, Kamm M, Dickson M, et al. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet*, **343** (1994) 1249–1252.

54. Ekblom A, Helmick C, Zack M, et al. Increased risk of large bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet*, 336 (1990) 357–359.
55. Lashner B and Epstein S. Industrial risk factors for colorectal cancer. *Int. J. Health Serv.*, 20 (1990) 459–483
56. Morgan R, Kaplan S, and Gaffey W. A general mortality study of workers in the painting and coating manufacturing industry. *J. Occup. Med.*, 23 (1981) 13–21.
57. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, et al. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2008; 300:2765.
58. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, et al. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008; 134:388
59. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol* 2011; 22:1958.
60. Harnack L, Jacobs DR Jr, Nicodemus K, et al. Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr Cancer* 2002; 43:152.

61. Martínez ME, Giovannucci E, Spiegelman D, et al. Leisure-time physical activity, body size, and colon cancer in women. Nurses' Health Study Research Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:948.
62. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, et al. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med* 1995; 122:327.
63. Renehan AG, Tyson M, Egger M, et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371:569.
64. Kampman E, Potter J, Slattery M, et al. Hormone replacement therapy, reproductive history, and colon cancer: a multi-center case-control study in the United States. *Cancer Causes Control*, **8** (1997) 146–158.
65. Troisi R, Schairer C, Chow W-H, et al. A prospective study of menopausal hormones and risk of colorectal cancer in the United States. *Cancer Causes Control*, **8** (1997) 130–138
66. Fukuda I, Hizuka N, Murakami Y, et al. Clinical features and therapeutic outcomes of 65 patients with acromegaly at Tokyo Women's Medical University. *Intern Med* 2001; 40:987.



67. Park JM, Choi MG, Kim SW, et al. Increased incidence of colorectal malignancies in renal transplant recipients: a case control study. *Am J Transplant* 2010; 10:2043.
68. Yang YX, Hennessy S, Lewis JD. Type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3:587.
69. Nilsen TI, Vatten LJ. Prospective study of colorectal cancer risk and physical activity, diabetes, blood glucose and BMI: exploring the hyperinsulinaemia hypothesis. *Br J Cancer* 2001; 84:417.
70. He J, Stram DO, Kolonel LN, et al. The association of diabetes with colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort. *Br J Cancer* 2010; 103:120.
71. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, et al. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? *Am J Gastroenterol* 2011; 106:1911.
72. Ma J, Giovannucci E, Pollak M, et al. A prospective study of plasma C-peptide and colorectal cancer risk in men. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:546.

73. Yang YX, Hennessy S, Lewis JD. Insulin therapy and colorectal cancer risk among type 2 diabetes mellitus patients. *Gastroenterology* 2004; 127:1044.
74. Campbell PT, Deka A, Jacobs EJ, et al. Prospective study reveals associations between colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus or insulin use in men. *Gastroenterology* 2010; 139:1138.
75. Dehal AN, Newton CC, Jacobs EJ, et al. Impact of diabetes mellitus and insulin use on survival after colorectal cancer diagnosis: the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. *J Clin Oncol* 2012; 30:53.
76. Gillessen S, Templeton A, Marra G, et al. Risk of colorectal cancer in men on long-term androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:1760.
77. Lin JH, Giovannucci E. Sex hormones and colorectal cancer: what have we learned so far? *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:1746.
78. Tocchi A, Basso L, Costa G, et al. Is there a causal connection between bile acids and colorectal cancer? *Surg Today* 1996; 26:101.

- 79.Chan AO, Jim MH, Lam KF, et al. Prevalence of colorectal neoplasm among patients with newly diagnosed coronary artery disease. *JAMA* 2007; 298:1412.
- 80.Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Potter JD. Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus, and human papillomavirus. *Cancer Epidemiol*
- 81.Boleij A, van Gelder MM, Swinkels DW, Tjalsma H. Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011; 53:870.
- 82.. Bini EJ, Park J, Francois F. Use of flexible sigmoidoscopy to screen for colorectal cancer in HIV-infected patients 50 years of age and older. *Arch Intern Med* 2006; 166:1626.
83. Clifford GM, Polesel J, Rickenbach M, et al. Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:425.

84. Lieberman DA, Weiss DG, Bond J, et al. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, **343** (2000) 162–168.
85. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, et al. Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *N. Engl. J. Med.*, **343** (2000) 169–174.
86. Haynes AB, Weiser TG, Berry WR, Lipsitz SR, Breizat AS, Dellinger EP et al. A Surgical Safety Checklist to Reduce Morbidity and Mortality in a Global Population. *N Engl J Med* 2009; 360:491-499
87. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 919-932.
88. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003; 138: 560-570.
89. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M, et al. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology.* 2001; 121: 830-838.

90. Clinical practice guideline. Prevention of colorectal cancer. 2009 update. Asociación Española de Gastroenterología. Castells A, Marzo-Castillejo M, Mascort JJ, Amador FJ, Andreu M, Bellas B, et al. Gastroen; ; Castells A, Marzo-Castillejo M, Mascort JJ, et al. Prevención del cáncer colorrectal. Actualización 2009. Gastroenterol Hepatol. 2009; 32:717.e1-58.
91. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, Miedema B, Ota D, Sargent D, National Cancer Institute Expert Panel Natl Cancer Inst. 2001;93(8):583.
92. De Gramont A, Banzi M, Navarro M, et al. Oxaliplatin/5FU/LV in adjuvant colon cancer: results of the international randomized MOSAIC trial [abstract 1015]. Proc Am Soc Clin Oncol 2003;22:253.
93. Comparison of fluorouracil with additional levamisole, higher-dose folinic acid, or both, as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: a randomised trial. QUASAR Collaborative Group. Lancet 2000;355:1588-96)
94. Desch CE, Benson AB, Somerfield MR, Flynn PJ, Krause C, Loprinzi CL, et al. Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. J. Clin. Oncol. 2005 Nov 20;23(33):8512-8519.

95. Jeffery M, Hickey BE, Hider PN. Follow-up strategies for patients treated for non-metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(1):CD002200.
96. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol.* 2009; 27:2091-6.
97. Amado RG, Wolf M, Peters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(10):1626-1634.) Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E et al. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2006–2012.
98. Fiorica F, Cartei F, Licata A, Enea M, Ursino S, Colosimo C, Cammà C. Can chemotherapy concomitantly delivered with radiotherapy improve survival of patients with resectable rectal cancer? A meta-analysis of literature data. *Cancer Treat Rev.* 2010;36:539-49
99. Glimelius B; Oliveira J. Rectal cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and followup. *Annals of Oncol* 2009; 20 (Supplement 4): iv54–iv56.

100. Meyerhardt JA, Mangu PB, Flynn PJ, Korde L, Loprinzi CL, Minsky BD, Petrelli NJ, Ryan K, Schrag DH, Wong SL, Benson AB 3<sup>rd</sup>. Follow-up care, surveillance protocol, and secondary prevention measures for survivors of colorectal cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. American Society of Clinical Oncology; J Clin Oncol. 2013;31(35):4465.
101. Baron JA and Sandler RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu. Rev. Med.* 51 (2000) 511–523.; 46. Thun MJ, Namboodiri MM, and Heath CWJ. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N. Engl. J. Med.*, 325 (1991) 1593–1596.
102. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, and Willett WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenomas in male health professionals. *Ann. Intern. Med.*, 121 (1994) 241–246.
103. Bansal P and Sonnenberg A. Risk factors of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 91 (1996) 44–48.
104. Waddell WR and Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. *J. Surg. Oncol.*, 24 (1983) 83–87.
105. Pasricha PJ, Bedi A, O'Connor K, Rashid A, Akhtar AJ, Zahurak ML, et al. The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, **109** (1995) 994–998.

106. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.*, 342 (2000) 1946–1952.
107. Castells A, Marzo-Castillejo M, Mascort JJ, Amador FJ, Andreu M, Bellas B, et al. Clinical practice guideline. Prevention of colorectal cancer. 2009 update. Asociación Española de Gastroenterología. *Gastroenterol Hepatol.* 2009; 32: 7
108. Ahnen DJ, Macrae FA. Clinical manifestations, diagnosis, and staging of colorectal cancer. [Monografía en Internet]. Walthman (MA): UpToDate; 2010
109. Noguera Aguilar JF<sup>1</sup>, Amengual Antich I, Morón Canis JM, Plaza Martínez A, Martínez Córcoles JA, Tortajada Collado C, Pujol Tugores JJ. “Effect of rofecoxib on colon chemical carcinogenesis at colonic anastomotic area in the rat.” *Rev Esp Enferm Dig.* 2005 Jun;97(6):405-15.



110. Noguera Aguilar JF, Amengual Antich I, Plaza Martínez A, Ibarra de la Rosa J, Tortajada Collado C, Gamundí Gamundí A, Pujol Tugores JJ. "Cyclooxygenase-2 inhibition in colon experimental carcinogenesis". *Rev Esp Enferm Dig.* 2005 Sep; 97(9):637-47.
111. Perse M, Zebic A, Cerar A. "Rofecoxib does not inhibit aberrant crypt foci formation but inhibits later steps in the development of experimental colorectal cancer: rofecoxib in experimental colon cancer". *Scand J Gastroenterol.* 2005 Jan; 40(1):61-7.
112. Shattuck-Brandt RL, Varilek GW, Radhika A et al. "Cyclooxygenase-2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10 mice". *Gastroenterology* 2000; 118:337-345.
113. Sinicrope FA, Gill S. "Roll of Cyclooxygenase-2 in colorectal cancer". *Cancer Metastasis Rev.* 2004; 23 (1-2): 63-75
114. Noguera Aguilar JF, Plaza Martínez A, Amengual Antic I, Morón Camis JM, Tortajada Collado C, Pujol Tugores JJ. "Influencia del Rofecoxib en la carcinogénesis cólica experimental en ratas" *Rev. Esp. Enferm. Dig* 2004; 96 (10): 678-687.
115. Walmesley AJ<sup>1</sup>, Zweiri J, Christmas SE, Watson AJ. "Rofecoxib has different effects on chemokine production in colorectal cancer cells and tumor immune splenocytes". *J Immunother.* 2007 Sep; 30(6):614-23.

116. Zhang Y, Hoda MN, Zheng X, Li W, Luo P, Maddipati KR, Seki T, Ergul A, Wang MH. "Combined therapy with COX-2 inhibitor and 20-HETE inhibitor reduces colon tumor growth and the adverse effects of ischemic stroke associated with COX-2 inhibition". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 .Sep 15; 307(6):R693-703.
117. Tachimori A, Yamada N, Amano R, Ohira M, Hirakawa K . "Combination therapy of S-1 with selective cyclooxygenase-2 inhibitor for liver metastasis of colorectal carcinoma". *Anticancer Res*. 2008 Mar-Apr; 28(2A):629-38.
118. Diario oficial de la Unión Europea. DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
119. BOE núm. 252 de 21 de Octubre de 2005.
120. Lynch PM. "Chemoprevention with special reference to inherited colorectal cancer". *Fam Cancer*. 2008; 7(1):59-64. Epub 2007 Aug 7.
121. Kune GA, Kune S, Watson LF. "Colorrectal cancer risk, chronic illness, operation and medication: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study". *Cancer Res* 1998; 48:4399- 4404.
122. Pozhariski KM, Likhachev AJ, Klimashevski VF, Shaposhnikov JD. "Experimental intestinal cancer research with special reference to human pathology". *Adv Cancer Res*. 1979; 30: 165-237.

123. Newberne PM, Rogers AE. "Animal model: DMH-induced adenocarcinoma of the colon in the rat". *Am. J. Pathol* 1973; 72: 541-544.
124. Fujimura, Takashi; Ohta, Tetsuo; Oyama, Katsunobu. "Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Carcinogenesis and Selective COX-2 Inhibitors for Chemoprevention in Gastrointestinal Cancers". *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 12/2007, Volumen 38, Número 2.
125. Almendingen, Kari; Larsen, Laila N; Fausa, Olav. "Selective COX-2 inhibition affects fatty acids, but not COX mRNA expression in patients with FAP". *Familial Cancer*, 12/2010, Volumen 9, Número 4
126. Liao, Zhongxing; Mason, Kathryn A; Milas, Luka. "Cyclo-Oxygenase-2 and its Inhibition in Cancer: Is There a Role?" *Drugs*, 2007, Volumen 67, Número 6.
127. Reddy BS, Rao CV. "Colon cancer: a role for cyclooxygenase-2 specific nonsteroidal anti-inflammatory drugs". *Drugs Aging* 2000; 16 (5): 329-334.
128. Gupta RA, Dubois RN. "Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2". *Nat Rev Cancer* 2001; 1:11-21.
129. Bocca C<sup>1</sup>, Bozzo F, Ievolella M, Miglietta A. "A novel nitro-oxy substituted analogue of rofecoxib reduces human colon cancer cell growth." *Mol Cell Biochem*. 2012 Feb;361(1-2):105-10. doi: 10.1007/s11010-011-1094-9. Epub 2011 Oct 15.

