

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA

**QUIMIOPROFILAXIS DEL  
CARCINOMA DE COLON CON EL  
INHIBIDOR ESPECIFICO DE LA  
CICLOXIGENASA-2 CELECOXIB**

*Francisco Manuel Moreno Torres*

*Sevilla, 2009*

**Dña. INMACULADA SÁNCHEZ-MATAMOROS MARTÍN, CIRUJANA  
ADJUNTA AL SERVICIO DE CIRUGÍA GENERAL DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.**

**CERTIFICA:**

Que bajo mi dirección D. Francisco Manuel Moreno Torres, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado el trabajo titulado “Quimioprofilaxis del carcinoma de colon con el inhibidor específico de la cicloxigenasa-2 Celecoxib”, que reúne los requisitos exigibles a nivel científico y legal para ser defendido por su autor con el objeto de alcanzar el Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste lo firmo en Sevilla a Veinticinco de Marzo de 2009.

Fdo.: Inmaculada Sánchez-Matamoros Martín.

**D. LUÍS CAPITÁN MORALES, PROFESOR TITULAR DE CIRUGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.**

**CERTIFICA:**

Que bajo mi dirección D. Francisco Manuel Moreno Torres, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado el trabajo titulado “Quimioprofilaxis del carcinoma de colon con el inhibidor específico de la ciclooxigenasa-2 Celecoxib”, que reúne los requisitos exigibles a nivel científico y legal para ser defendido por su autor con el objeto de alcanzar el Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste lo firmo en Sevilla a Veinticinco de Marzo de 2009.

Fdo.: Luís Capitán Morales.

*A Teresa, mi Mujer.*

*A mis Hijas*

*M<sup>a</sup> Teresa y Reyes.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Escribir los agradecimientos de esta Tesis Doctoral significa haber concluido una etapa de intenso trabajo y años de dedicación, en colaboración con muchos profesionales del Hospital Virgen Macarena de Sevilla. Trabajar con ellos ha sido para mí un gran honor, vaya de antemano mi agradecimiento a todos.

Quisiera expresar mi admiración y agradecimiento a mi Director de Tesis el Dr. D. Luís Capitán Morales, creador del proyecto, por su intensa labor de asesoramiento y aliento durante el desarrollo del trabajo, por su disponibilidad y paciencia durante todos estos años, para solventar cuantas dudas y problemas han surgido, por haber encontrado en él además de un modelo profesional como médico y cirujano con una enorme vocación docente, científica y quirúrgica, una fuente de motivación, gran persona y amigo.

A la Dra. Dña. Inmaculada Sánchez Matamoros, codirectora de este proyecto, sin su colaboración no hubiera podido llevar a cabo esta Tesis, gracias por todo ese tiempo que de forma desinteresada ha dedicado, tanto en el trabajo experimental de campo como en el posterior desarrollo y redacción del mismo, en ella he encontrado además de una gran profesional, ejemplo de dedicación, compañera y verdadera amiga.

Al Dr. D. Francisco Rivera por sus consejos y apoyo moral, quien de forma desinteresada dedicó parte de su tiempo al estudio anatómico-patológico del trabajo.

Al profesor D. Juan Polo por su paciencia e inestimable ayuda en la realización del trabajo estadístico.

A todos los profesionales del Departamento de Cirugía del Hospital Virgen Macarena por su apoyo y aliento constantes.

A las profesionales de enfermería Dña. Dolores Sánchez-Matamoros y Dña. Carmen García, quienes siempre estuvieron dispuestas para echar una mano en el proyecto.

A todas y cada una de las personas e instituciones que de alguna forma u otra han ayudado a que esta Tesis fuera realidad.

Finalmente debo un agradecimiento especial a mi esposa, Teresa, por soportar en tantas ocasiones mis ausencias y cambios de humor.

A mis hijas M<sup>a</sup> Teresa y Reyes por el tiempo que les he robado.

**GRACIAS**

# **ÍNDICE**

**1.- Introducción**

1.1 -Antecedentes y estado actual del Carcinoma de Colon.	5
1.1.1- Estadios del Cáncer de Colon	9
1.1.2- Definiciones TNM	11
1.1.3- Agrupación por estadios de AJCC	13
1.1.4- Algunos aspectos en el tratamiento del Cáncer de Colon	14
1.1.5- Cáncer de Colon recurrente local	18
1.1.6- Metástasis hepáticas	23
1.1.7- Nuevas terapias y combinaciones	25
1.1.8- Factores pronósticos	27
1.2- Inhibidores de la COX-2. Celecoxib	31
1.3 Carcinógeno químico. Azoximetano	35

**2.- Planteamiento del tema**

2.1- Antecedentes y estado actual	38
2.2- Hipótesis de trabajo	42
2.3- Objetivos concretos	44



### **3.- Material y Métodos**

3.1- Material	45
3.1.1.- Laboratorio	45
3.1.2.- Animales	46
3.1.3.- Azoximetano	48
3.1.4.- Celecoxib	48
3.1.5.- Material anestesia y material auxiliar	48
3.1.6.- Material Quirúrgico	50
3.2- Métodos	51
3.2.1.- Temporalidad del estudio	51
3.2.2.- Preparación y administración de fármacos	53
3.2.2.1.- Pesos y consumo de agua	53
3.2.2.2.- Administración de Celecoxib	56
3.2.2.3.- Administración de Azoximetano	60
3.2.3.- Métodos anestésicos	63
3.2.4.- Métodos quirúrgicos. Obtención de muestras	64
3.2.5.- Métodos anatomopatológicos	65
3.2.6.- Métodos estadísticos	68
3.2.7.- Mortalidad	68

<b>4.- <u>Resultados</u></b>	
4.1- Resultados anatomopatológicos	70
4.1.1- Macroscópicos	89
4.1.1.1.- De las piezas de colectomía	90
4.1.1.2.- Del estudio postmortem	94
4.1.1.3.- Estudio macroscópico de los pólipos	95
4.1.2- Microscópicos	96
4.1.2.1.- Lesiones tumorales invasivas	96
4.1.2.2.- Pólipos	97
4.2- Resultados estadísticos	99
4.2.1.- Mortalidad	99
4.2.2.- Presencia y número de pólipos y tumores	100
4.2.3.- Grados de Dukes de los tumores	102
4.3- Mortalidad	103
<b>5.- <u>Discusión</u></b>	108
<b>6.- <u>Conclusiones</u></b>	115
<b>7.- <u>Bibliografía</u></b>	118

# **1.- Introducción**

## **1.1-Antecedentes y estado actual del Carcinoma de Colon.**

El cáncer colorrectal (CCR) constituye un problema de salud pública a escala mundial. Tanto en Europa como en la mayoría de los países desarrollados representa el segundo cáncer más frecuente en ambos sexos y la segunda causa de muerte por cáncer. La tasa de mortalidad es de 20/30 fallecimientos por 100.000 habitantes de población estandar<sup>1</sup>. Más de 370.000 personas desarrollan cáncer colorrectal en Europa cada año, lo que representa un 13% del total de los casos de cáncer y unas 200.000 muertes. A pesar de que en los últimos años se han visto mejoras marginales en la mortalidad de los ciudadanos de raza blanca de EE.UU.<sup>1</sup> el pronóstico sigue siendo pobre. El porcentaje de supervivencia a los 5 años de un paciente con afectación de ganglios linfáticos (Dukes C) tras una resección quirúrgica es, aproximadamente, del 39%<sup>2</sup>.

En el 80% de pacientes sometidos a resección quirúrgica se obtiene la eliminación macroscópica completa de su enfermedad, mientras que el 50% experimentan una recidiva<sup>3</sup>. Por otra parte, aproximadamente un 25% de pacientes tienen una enfermedad avanzada en el momento de presentación<sup>1</sup>, cuando la única opción que queda es el tratamiento paliativo.

Las evidencias clínicas y moleculares sugieren que existen varios caminos somáticos hacia el cáncer colorrectal, y que dos de éstos se muestran semejantes a ciertos procesos

bien definidos descritos por formas heredadas de la enfermedad<sup>4</sup>. En muchos países, incluyendo Italia, Japón y China urbana, la incidencia del cáncer colorrectal ha aumentado rápidamente en la última mitad del siglo veinte<sup>5</sup>. Tales cambios han ocurrido dentro de una generación y sugieren un importante rol de las influencias ambientales en la etiología de esta enfermedad. Estudios epidemiológicos también han indicado factores ambientales, especialmente dietéticos, que parecen influir en los riesgos individuales de desarrollar cáncer colorrectal<sup>6</sup>. La occidentalización de las dietas, (pobres en vegetales y folatos, y ricas en grasas, parecen incrementar el riesgo relativo). La toma de carne roja puede doblar el riesgo de cáncer colorrectal<sup>6</sup>, el consumo de tabaco y alcohol, o el sedentarismo son factores ambientales con demostrada responsabilidad en el desarrollo del mismo. Sin embargo, la proporción del riesgo relativo para cada factor individual se muestra pequeña cuando se compara con factores unidos a otros cánceres, tales como fumar, que incrementa el riesgo de cáncer de pulmón casi 20 veces. Junto a ellos, la edad superior a 50 años, la existencia de enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn) o el padecimiento de síndromes de poliposis familiar o de cáncer colorrectal hereditario no polipoideo, aumentan el riesgo del individuo a desarrollar tumores colorrectales.

No obstante, se estima que no más del 10% de los cánceres colorrectales son de tipo familiar, mientras que el 90% restante es de origen esporádico. A causa de la frecuencia de la enfermedad, de la habilidad de identificar los grupos de alto riesgo, del probado crecimiento lento de las lesiones primarias, de la mejor supervivencia de los pacientes con lesiones en los primeros estadios y de la relativa simplicidad y precisión de las

pruebas de detección, los exámenes sistemáticos para el cáncer de colon deberían formar parte de la atención médica rutinaria de todos los adultos a partir de los 50 años, especialmente de aquellos cuyos parientes en primer grado han padecido cáncer colorrectal. Entre los grupos que tienen alta incidencia de cáncer colorrectal, como hemos dicho, figuran aquellos con afecciones hereditarias, tales como poliposis familiar, cáncer colónico no polipoideo hereditario o variantes I y II del síndrome de Lynch y colitis ulcerosa<sup>7</sup>. Todas estas afecciones juntas son responsables entre el 10% y 15% de los cánceres colorrectales.

Los pacientes con cáncer colónico no polipoideo hereditario tienen mejor pronóstico, en un análisis de supervivencia estratificado por estadios, que los pacientes con cáncer colorrectal esporádico, pero la naturaleza retrospectiva de los estudios y la posibilidad de factores selectivos dificultan la interpretación de esta observación<sup>8</sup>. Entre otras afecciones comunes que presentan riesgo incrementado tenemos los antecedentes de cáncer colorrectal o de adenomas de parientes en primer grado, así como los de cáncer de mama, endometrial u ovárico<sup>9, 10</sup>. Estos grupos de alto riesgo son responsables del 23% de todos los cánceres colorrectales. Si se limita la detección selectiva o la detección temprana de cáncer solamente a estos grupos de alto riesgo, se pasaría por alto la mayoría de los cánceres colorrectales<sup>11</sup>.

El cáncer colorectal es considerado un proceso multietapas, cuya fase más temprana se origina en la mucosa normal con la formación de focos de criptas aberrantes, lesiones que preceden al desarrollo de adenomas y adenocarcinomas. Esta evolución

morfológica resulta de la acumulación de alteraciones genéticas que implica la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores y anomalías en los genes implicados en la reparación del ADN. Junto a estas alteraciones y en íntima relación se producen la desregulación de los procesos de proliferación celular y apoptosis. Pero en la génesis del cáncer colorectal intervienen otros sistemas. En este sentido, hoy es ampliamente aceptada la participación de los sistemas nitrérgicos y el papel modulador del óxido nítrico en los distintos fenómenos implicados en la inducción y evolución del cáncer colorectal. Tanto a nivel clínico como experimental se ha demostrado que en el cáncer colorrectal existe una marcada producción de óxido nítrico (NO), como consecuencia de la desregulación que sufren sus enzimas sintetizadoras denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), que catalizan la reacción del oxígeno molecular con el aminoácido L-arginina para producir óxido nítrico y citrulina.

Existen muchas isoformas de la enzima NOS que se presentan en diferentes tipos de células. Las isoformas denominadas constitutivas (NOS<sub>c</sub>) son aquellas que se encuentran siempre presentes y tienen una producción basal de óxido nítrico en picomoles por cortos períodos (segundos a minutos). Se encuentran especialmente en las células endoteliales y en algunas neuronas y su función es producir NO que regule el tono vascular basal y la comunicación intercelular respectivamente. También han sido encontradas en plaquetas, leucocitos polimorfonucleares y células del músculo cardíaco. Las isoformas denominadas inducibles (NOS<sub>i</sub>) no son normalmente expresadas en las células y su producción es estimulada en macrófagos y fagocitos para desencadenar reacciones inmunológicas. Éstos liberan grandes cantidades de NO (nanogramos) de

forma sostenida bajo estímulo fisiopatológico, para así eliminar bacterias, parásitos y otros agentes patógenos. Sin embargo, las NOSi también pueden producirse en células diferentes como las del músculo liso vascular y miocitos cardiacos conduciendo a una acción cronotrópica e inotrópica negativa. La expresión de las NOSi es inhibida por glucocorticoides.

A pesar de todo, los mecanismos por los que opera la molécula son aún poco conocidos y su papel en la carcinogénesis colorrectal es permanentemente discutido.

La quimiopreención del cáncer puede definirse como la inhibición, retraso o inversión del proceso carcinogénico mediante recursos químicos<sup>12</sup>. La mayoría de ensayos se centran en la prevención de la carcinogénesis en un estadio premaligno o en una fase inicial de malignidad, lo cual se conoce como quimiopreención “primaria” o “secundaria”, dependiendo de si implica individuos normales o de alto riesgo. El tratamiento con agentes quimiopreventivos de pacientes que han sido tratados con éxito, de una enfermedad maligna primaria, pero que tienen un riesgo incrementado de una segunda neoplasia, se denomina quimiopreención “terciaria”<sup>13</sup>. Es notable que la definición original del término quimiopreención abarque también la inhibición del crecimiento y el retraso de la progresión de los cánceres<sup>14</sup>.

### **1.1.1.- Estadios del cáncer de colon**

Las clases histológicas del cáncer de colon son:

- Adenocarcinoma (la mayoría de los cánceres del colon).
  - Adenocarcinoma mucinoso (coloide).
  - Adenocarcinoma en anillo de sello.
- Tumor escirro.
- Neuroendocrino<sup>15</sup>. Los tumores con diferenciación neuroendocrina tienen característicamente un pronóstico más precario que las variantes de adenocarcinoma puro.

La selección del tratamiento debe fundarse en el esquema de clasificación TNM<sup>16</sup> en vez de en el de Dukes antiguo<sup>17</sup> o en el esquema de la clasificación de Astler-Coller modificada<sup>18</sup>.

El Comité estadounidense conjunto del cáncer (AJCC) y un panel patrocinado por el Instituto Nacional del Cáncer, recomendaron que se examinaran al menos 12 ganglios linfáticos en aquellos pacientes con cáncer de colon y cáncer rectal a fin de confirmar la ausencia de implicación ganglionar a causa del tumor<sup>16, 19, 20</sup>. Esta recomendación toma en consideración que el número de ganglios linfáticos examinados es el reflejo del carácter agresivo de la disección mesentérica vascular al momento de la resección



quirúrgica y la identificación patológica de los ganglios en el espécimen. Estudios retrospectivos han mostrado que el número de ganglios linfáticos examinados durante una cirugía rectal o de colon, podrían estar relacionados con los resultados del paciente<sup>21, 22, 23, 24</sup>.

El AJCC, ha definido la estadificación mediante la clasificación TNM<sup>16</sup>.

### **1.1.2.- Definiciones TNM**

-Tumor Primario (T)

- TX: No puede evaluarse el tumor primario
- T0: No hay indicación de tumor primario, está limitado a la mucosa.
- Tis: Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia (incluye células cancerosas confinadas a la membrana glandular basal, intraepitelial, o a la lamina propia, intramucosa, sin extensión a través de las mucosas musculares a la submucosa)
- T1: El tumor invade la submucosa
- T2: El tumor invade la muscularis propia
- T3: El tumor invade la subserosa o los tejidos pericólicos o perirrectales no peritonealizados a través de la muscularis propia

- T4: El tumor invade directamente otros órganos o estructuras o perfora el peritoneo visceral o ambos. La invasión directa en T4 incluye la invasión de otros segmentos colorrectales por vía serosa; por ejemplo, invasión del colon sigmoideo por un carcinoma del ciego. El tumor adherente macroscópicamente a otros órganos o estructuras, se clasifica como T4. Sin embargo, si no hay tumor presente en la adherencia, microscópicamente, la clasificación deberá ser pT3. Los subestadios V y L deben utilizarse para identificar de la presencia o ausencia de infiltración vascular o linfática.

- Ganglios linfáticos regionales (N)

- NX: No pueden evaluarse los ganglios regionales
- N0: No hay metástasis de los ganglios linfáticos regionales
- N1: Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales
- N2: Metástasis en 4 ó más ganglios linfáticos regionales

Un nódulo tumoral en el tejido adiposo pericorrectal de un carcinoma primario sin evidencia histológica de ganglio linfático residual en el nódulo, se clasifica en la categoría pN como metástasis de ganglio linfático regional si el nódulo tiene la forma y el contorno uniforme de un ganglio linfático. Si el ganglio tiene un contorno irregular debe clasificarse en la categoría T y codificarse como V1 (invasión venosa microscópica) o como V2 (si era macroscópicamente evidente), ya que existe una gran probabilidad de que represente infiltración venosa.

-Metástasis distante (M)

- MX: No puede evaluarse la metástasis distante
- M0: No hay metástasis distante
- M1: Metástasis distante

### **1.1.3.- Agrupación por estadios del AJCC**

#### Estadio 0

- Tis, N0, M0

#### Estadio I

- T1, N0, M0
- T2, N0, M0

#### Estadio IIA

- T3, N0, M0

#### Estadio IIB

- T4, N0, M0

#### Estadio IIIA

- T1, N1, M0
- T2, N1, M0

Estadio IIIB

- T3, N1, M0
- T4, N1, M0

Estadio IIIC

- Cualquier T, N2, M0

Estadio IV

- Cualquier T, cualquier N, M1

#### **1.1.4.- Algunos aspectos del tratamiento del cáncer de colon**

El tratamiento del cáncer de colon va a depender del estadio en el que se encuentre en el momento de su diagnóstico.

**-Cáncer de colon en estadio 0:** Es la más superficial de todas las lesiones y está limitada a la mucosa sin invasión de la lámina propia. Debido a su naturaleza superficial, el procedimiento quirúrgico puede estar limitado:

- Escisión local o polipectomía simple con márgenes claros.

- Resección del colon en lesiones mayores no susceptibles de ser tratadas con una escisión local.

**-Cáncer de colon en estadio I:** (estadio A de Dukes o A y B1 de Astler-Coller Modificado). Debido a su naturaleza localizada, el estadio I tiene una alta tasa de cura. Las opciones de tratamiento serían:

- Resección quirúrgica amplia y anastomosis.

**-Cáncer de colon en estadio II:** (estadio B de Dukes o B2 y B3 de Astler-Coller Modificado). Las opciones de tratamiento serían:

- Resección quirúrgica amplia y anastomosis.

- Terapia adyuvante

El valor potencial que pueda tener la terapia adyuvante para los pacientes con cáncer de colon en estadio II (B de Dukes o MAC B2 o B3) también sigue siendo polémico. Aunque el riesgo de recurrencia de algunos subgrupos de pacientes con cáncer de colon en estadio II puede ser mayor que el promedio (incluso aquellos con características anatómicas como adherencia tumoral a estructuras adyacentes, perforación, obstrucción completa o con características biológicas como aneuploidia, análisis elevado de fase S o delección del 18q), no hay pruebas concluyentes de que la quimioterapia a base de

fluorouracilo-5 esté relacionada con una mejor supervivencia global cuando se compara con la cirugía sola<sup>25</sup>. Los investigadores del National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (Proyecto Nacional de Cirugía Adyuvante de Mama e Intestinos) han indicado que la reducción del riesgo de recurrencia para los pacientes con enfermedad en estadio II que reciben terapia adyuvante es de una magnitud semejante a la ventaja observada en los pacientes con enfermedad en estadio III y tratados con terapia adyuvante, aunque no se ha establecido ninguna ventaja global de supervivencia<sup>26</sup>. Un ensayo aleatorio que estudió el uso postoperatorio de fluorouracilo y levamisol en comparación con la cirugía sola no mostró que haya ninguna ventaja de supervivencia con la quimioterapia adyuvante postoperatoria<sup>25</sup>. Un metaanálisis de 1.000 pacientes en estadio II cuya experiencia se obtuvo de una serie de ensayos, indicó que hay una ventaja de 2% en la supervivencia sin enfermedad a los 5 años cuando los pacientes tratados con terapia adyuvante de fluorouracilo-5 y leucovorina se comparan a los grupos de control que no recibieron tratamiento<sup>27</sup>.

**-Cáncer del colon en estadio III:** (Estadio C de Dukes o C1-C3 de Astler-Coller Modificado). Las opciones de tratamiento serían:

El cáncer de colon en estadio III denota afectación de ganglios linfáticos. Algunos estudios indican que el número de ganglios linfáticos comprometidos modifica el pronóstico: los pacientes que tienen entre 1 y 3 ganglios comprometidos tienen una

probabilidad significativamente mayor de supervivencia que aquellos con 4 ganglios comprometidos.

- Resección quirúrgica amplia y anastomosis.

- Quimioterapia postoperatoria. El análisis de exámenes retrospectivos parece indicar mejores resultados en el tratamiento con radioterapia postoperatoria de ciertos subgrupos de pacientes (T3 o T4, ubicación del tumor en sitios inmóviles, perforación local, obstrucción y enfermedad residual después de la resección)<sup>28, 29, 30, 31, 32, 33</sup>.

**-Cáncer de colon en estadio IV y recurrente:** (estadio D de Astler-Coller Modificado). Las opciones de tratamiento serían:

El cáncer de colon en estadio IV denota enfermedad metastásica distante. El tratamiento para el cáncer de colon recurrente depende de los sitios de enfermedad recurrente que se manifiesten en el examen físico o en los estudios radiográficos o ambos. Además de los procedimientos radiográficos habituales, la radioinmunocentelleografía puede agregar información clínica que influya en la selección del tratamiento<sup>34</sup>. Estos enfoques, sin embargo, no han producido mejoras en los resultados a largo plazo.

- Resección quirúrgica del cáncer recurrente local.

- Resección quirúrgica/anastomosis o derivación de las lesiones primarias obstructoras o sangrantes, en casos metastásicos seleccionados.

-Resección de metástasis del hígado o ablación en pacientes seleccionados<sup>35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44</sup>

-Resección de metástasis aisladas pulmonares u ováricas en pacientes seleccionados.

-Radioterapia paliativa.

-Quimioterapia paliativa.

-Resección quirúrgica de metástasis aisladas (hígado, pulmón, ovarios)<sup>35, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 45</sup>

-Ensayos clínicos que evalúan nuevos fármacos y terapia biológica.

-Ensayos clínicos que comparan varios regímenes de quimioterapia o de terapia biológica, solas o en combinación (Folfox, Folfiri, solos o asociados a anticuerpos monoclonales: Bevacizumav, Cetuximav entre otros).

### **1.1.5.- Cáncer de colon recurrente local**

El cáncer de colon recurrente local (como lo sería una recurrencia en la línea de sutura) puede ser resecable.



Los datos de incidencia del cáncer colorrectal lo sitúan en estos momentos en la segunda causa de muerte por cáncer; la recidiva es la causa de la mayoría de las muertes tras cirugía con intención curativa. Los factores asociados a la recidiva locoregional se relacionan fundamentalmente con las características histopatológicas y el grado de invasión del tumor.

Tras la cirugía curativa, los enfermos deben ser controlados para intentar detectar la recidiva asintomática. La recurrencia local aislada del cáncer colorrectal se sitúa, en el momento del diagnóstico, entre el 20 y el 30% de los casos, pero incluso con metástasis hepáticas o pulmonares se puede intentar la cirugía curativa, el éxito depende de una correcta valoración preoperatoria multidisciplinaria. Cuando el diagnóstico se realiza en una fase incurable, nuestra misión es mejorar la calidad de vida.

Sabemos que en estos momentos el cáncer colorectal es la segunda causa de muerte por cáncer en España donde se diagnostican 25.000 nuevos casos al año y fallecen en ese mismo período por esta enfermedad 12.500 personas<sup>46</sup>. En el momento del diagnóstico, sólo el 80% será potencialmente curable; de éstos, el 40% desarrollará recidivas locales o a distancia; menos del 25% de estas recidivas serán resecables, y la probabilidad de resección curativa es directamente proporcional al tiempo de detección de ésta<sup>47</sup>. En cualquier caso, y de manera global, sólo la mitad de los pacientes con carcinomas de colon y recto vivirá más de 5 años y la recidiva, como hemos dicho, es la causa de la mayoría de las defunciones tras cirugía con intención curativa<sup>48</sup>.

Estrictamente hablando, una recidiva es la aparición de células tumorales originarias del cáncer primitivo en cualquier parte del organismo, tras haber realizado cirugía o cualquier modalidad de tratamiento. En este sentido, la recidiva o recurrencia se puede entender realmente como una reactivación de la enfermedad primaria.

En el cáncer colorectal las recidivas locales, es decir, aquellas que se producen en la anastomosis, en el campo operatorio peritumoral, el territorio linfático mesentérico, los trayectos de los drenajes o la herida quirúrgica, sin ser patrimonio exclusivo del cáncer de recto sí son mucho más frecuentes, sobre todo en el recto medio y bajo, pues hay datos suficientes de que el recto alto o tercio proximal presenta la misma frecuencia de recidivas locales que el resto del colon<sup>49</sup>.

La recidiva ocurre cuando tras completar el tratamiento radical adecuado se han dejado células viables en el paciente. Aunque se podría pensar que el problema estaría en la presencia de enfermedad residual microscópica<sup>50</sup> no se ha descartado que en ocasiones la recidiva dependa de la exfoliación celular durante el acto quirúrgico. Así, los exudados de colágeno y fibrina expuestos durante la disección y apertura de los tejidos, junto con la liberación de factores tisulares de crecimiento como respuesta al traumatismo, convierten el campo operatorio en un buen caldo de cultivo para la fijación y el desarrollo de las células neoplásicas<sup>51, 52</sup>.

Ante la imposibilidad de identificar, con los medios actuales, las células liberadas o las micrometástasis se ha hecho especial hincapié en identificar a aquellos pacientes con

riesgo para desarrollar una recidiva. Aunque se han asociado muchos, básicamente y siendo eminentemente prácticos, los factores de mayor interés y significación ligados a la recidiva locorregional dependerán de las características particulares del tumor en cuanto a estadificación (penetración en la pared y los ganglios linfáticos afectados), tamaño y grado de diferenciación. En este sentido, la frecuencia de recidivas es directamente proporcional al estadio de la lesión, más frecuente en estadios más avanzados y para los tumores pobremente diferenciados. Actualmente, en gran medida, las decisiones en cuanto al tratamiento más adecuado y seguimiento se basan en la adecuada clasificación de los pacientes. El tratamiento de la recidiva comienza en el mismo momento en que se establece el diagnóstico de cáncer. En el cáncer de recto, la radioterapia preoperatoria pretende disminuir el porcentaje de recidivas modificando las características anatomoclínicas negativas del tumor; de hecho, por sí sola la radioterapia se ha demostrado beneficiosa al disminuir significativamente la tasa de recurrencia local<sup>53</sup>.

En el colon, los planos y las delimitaciones anatómicas quirúrgicas son claros; en el recto se debe luchar por conseguir un adecuado margen circunferencial, con una disección limpia en el plano avascular del mesorrecto con los tejidos parietales de pared pelviana, sacro, vejiga, próstata o vagina, practicándose una exéresis mesorrectal completa o con una distancia del límite inferior del tumor de al menos 5 cm.

Todo paciente con cáncer colorrectal puede desarrollar recurrencia, ya sea locorregional, a distancia o ambas. Sabemos que se presentarán en el 80% de las

ocasiones antes de los primeros 2 años de postoperatorio y en la práctica totalidad antes de los 4 años. Sabemos que si existe alguna posibilidad de curación, ésta dependerá de que podamos realizar una adecuada resección en bloque con márgenes libres, y conocemos que esto se logra generalmente cuando la recidiva se ha detectado en fase asintomática. Más aún, se sabe también que la incidencia de un segundo cáncer colorrectal ocurre con una frecuencia acumulativa constante del 3% cada 6 años. La conclusión parece clara, se debe seguir a los pacientes con la intención de detectar la recidiva asintomática o una tumoración metacrónica. Ésta es, al menos, la conclusión aconsejada tras una reciente revisión<sup>54</sup> que analiza la mejor evidencia disponible en estos momentos.

Una vez diagnosticada (o sospechada) la recidiva locorregional, la cirugía ofrece las mayores posibilidades de curación, pero a veces son necesarias otras técnicas en un intento, muchas veces desesperado, de lograrla.

La confirmación de recidiva pelviana es, en muchos casos, difícil ya que los medios diagnósticos habituales tienen dificultades para diferenciarla de los cambios originados por la cirugía o la radioterapia previas. La mayoría de los pacientes sometidos a amputación abdominoperineal desarrollan una masa fibrótica presacra y la radiación causa una reacción inflamatoria de los tejidos pelvianos que provoca un engrosamiento de los tejidos perirectales. Cualquiera de estos cambios se ven en la tomografía computarizada (TC) o en la resonancia magnética (RM), pero son indistinguibles de la recidiva local; en estos casos la tomografía por emisión de positrones (PET) es de gran

ayuda (puede llegar a una sensibilidad de hasta un 90%, con un valor predictivo positivo de hasta un 88% y un valor predictivo negativo de hasta un 92%). Además de las ya citadas, se aconseja la radiografía de tórax para el rastreo de enfermedad pulmonar y la TC ósea ante el dolor osteoarticular.

Las recidivas pelvianas del cáncer de recto pueden alcanzar en su desarrollo las paredes laterales de la pelvis, el sacro o el promontorio y los órganos pelvianos adyacentes. Si los órganos afectados son la vejiga urinaria, la próstata o los órganos femeninos, la exanteración pelviana puede ser suficiente. En casos más avanzados puede ser necesaria la resección en bloque, incluyendo el sacro con abordajes abdominosacros.

La radioquimioterapia se puede utilizar en casos en que no se haya usado previamente, con la idea de reducir la masa y posibilitar o facilitar la resección.

En los últimos años hemos vivido un considerable avance en la eficacia de la quimioterapia para la enfermedad colorrectal avanzada. Hemos pasado de apenas un 10% de respuestas con la introducción del 5-fluorouracilo en la década de 1960 hasta la posibilidad de alcanzar más del 50% de respuestas con los regímenes de quimioterapia basados en oxaliplatino o irinotecán (FOLFOX + Cetuximav). Este hecho ha permitido la aplicación del concepto de quimioterapia preoperatoria o neoadyuvante en una enfermedad avanzada.

En estos momentos la quimioterapia se basa en su primera línea de fármacos en regímenes como FOLFOX (5-fluorouracilo + leucovorin + oxaliplatino) o FOLFIRI (5-fluorouracilo + leucovorin + irinotecan) solos o asociados a anticuerpos monoclonales (Bevacizumab, Cetuximab). La combinación irinotecán + folinato + fluoruracilo en bolo semanal se convirtió en uno de los estándares de manejo en cáncer colorrectal metastásico<sup>55</sup>.

La recidiva aislada perianastomótica ofrecerá las mayores posibilidades de resección con márgenes libres, incluso permitiendo una nueva anastomosis, si bien en el recto la amputación abdominoperineal es la norma. Las recidivas en la pared abdominal son raras y se asocian generalmente a enfermedad diseminada. El tratamiento de este tipo de recidivas tomó un nuevo auge con la llegada del abordaje laparoscópico del cáncer de colon y recto, y así, a principio de los años noventa, aparecieron alarmantes series con porcentajes elevados de recidivas en las zonas de inserción de los trócares. En la actualidad, la mayoría de los autores están de acuerdo en que, si bien existen y hay que tener presente una serie de cuidados en la manipulación de la pieza, las recidivas en la pared abdominal son muy infrecuentes; ahora bien, si ocurren, por lo general son catastróficas para el paciente, que es difícilmente recuperable.

### **1.1.6.- Metástasis en hígado**

Aproximadamente al 50% de los pacientes con cáncer de colon se les diagnosticaran metástasis hepáticas, ya sea en el momento de la presentación inicial o

como resultado de recurrencia de la enfermedad. Aunque sólo una proporción pequeña de los pacientes con metástasis hepáticas son aptos para someterse a resección quirúrgica, los avances en las técnicas de ablación del tumor y en la administración de quimioterapia regional y sistémica ofrecen varias opciones de tratamiento. La mayor tasa de respuestas obtenida con las nuevas combinaciones de quimioterapia para la enfermedad avanzada ha favorecido la posibilidad de inducir la reseabilidad en pacientes considerados previamente irresecables.

Para los pacientes con metástasis hepáticas que se consideren resecables (fundándose en el número limitado de lesiones, ubicación intrahepática de las mismas, carencia de complicación vascular mayor, ausencia de enfermedad extrahepática o enfermedad extrahepática limitada, y suficiente reserva hepática funcional), un margen de resección negativo ha dado como resultado tasas de supervivencia a los 5 años de 25% a 40% en la mayoría de los estudios no aleatorios<sup>38, 40, 56, 57, 58, 59</sup>.

Para los pacientes con metástasis hepáticas que se consideren irresecables, la ablación por radiofrecuencia ha surgido como una técnica segura (2% de morbilidad mayor, tasas de mortalidad de <1%) que puede ofrecer control tumoral a largo plazo<sup>60, 61, 62, 63, 64, 65</sup>. La ablación crioquirúrgica<sup>66, 67, 68</sup> sigue siendo una opción para los pacientes con ciertos tumores no susceptibles a la resección.

Otras técnicas ablativas locales que se han utilizado para tratar las metástasis del hígado comprenden embolización y radioterapia intersticial<sup>69, 70</sup>. Los pacientes con metástasis pulmonares limitadas, y los pacientes con ambas metástasis, pulmonares y hepáticas, también pueden ser aptos para someterse a resección quirúrgica, lo que ofrece una supervivencia posible a los 5 años en pacientes bien seleccionados<sup>45, 71, 72</sup>.

En aquellos casos con criterios de mal pronóstico estaría indicada la administración de quimioterapia neoadyuvante (preoperatoria) o coadyuvante (postoperatoria), aunque sería importante poderlos incluir en ensayos clínicos prospectivos.

### **1.1.7.- Nuevas terapias y combinaciones**

En la reunión de la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica de 2003, se presentaron los resultados de 2 ensayos aleatorios que incorporaron terapias novedosas para los pacientes con cáncer colorrectal<sup>64, 73</sup>.

Los resultados de un ensayo aleatorio que comparó IFL(irinotecan, 5-fluororacilo, leucovorin)/placebo con IFL/bevacizumab (un anticuerpo monoclonal, contra el receptor de factores de crecimiento endotelial vascular, inhibiendo o reduciendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, necesarios para promover el crecimiento de



células cancerosas) en 925 pacientes con cáncer colorrectal metastásico<sup>64</sup>. Bevacizumab fue administrado en una dosis de 5 mg/kg una semana sí y otra no. La mediana de supervivencia sin evolución de la enfermedad de los pacientes tratados con IFL más bevacizumab fue de 10,6 contra 6,2 meses ( $p = 0,00001$ ) para los pacientes tratados con IFL y placebo, y la mediana de supervivencia global fue de 20,3 contra 15,6 meses ( $p = 0,00003$ ), respectivamente. Las tasas de respuesta global fueron también superiores para el régimen que contenía bevacizumab (44,9 contra 34,7%;  $p = 0,029$ ) mejorando la supervivencia. Sin embargo los pacientes tratados con bevacizumab e IFL tuvieron una incidencia global más elevada de efectos tóxicos de grado 3 a 4 (85% contra 74%,  $p = <0,01$ )<sup>64</sup>.

El segundo estudio<sup>73</sup> comparó cetuximab, un anticuerpo monoclonal IgG1 cuya diana es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), sólo o en combinación con irinotecán en 329 pacientes con cáncer colorrectal refractarios al mismo. Los pacientes tratados con el régimen de combinación tuvieron una tasa de respuesta significativamente más elevada, de 22,9% comparada con 10,8% para los pacientes tratados con cetuximab sólo ( $p=0,0074$ ) y mayor tiempo hasta el fracaso del tratamiento (4,1 meses contra 1,5 meses,  $p>0,0001$ ), pero no hubo mejoría significativa en la supervivencia mediana entre los brazos del ensayo. En este sentido, hay que poner énfasis en los resultados obtenidos en los últimos estudios de combinación de quimioterapia y cetuximab. En el congreso de la Sociedad Americana de Oncología se han presentado los resultados del estudio CRYSTAL (fase III) de tratamiento de

primera línea del cáncer colorrectal avanzado. En este estudio, los pacientes se aleatorizaron a recibir FOLFIRI sólo o la combinación de éste y cetuximab. La tasa de respuestas se incrementó significativamente en el grupo tratado con cetuximab (46,9% frente a 38,7%;  $p= 0,005$ ). En este grupo de pacientes (608) se consiguieron 10 resecciones de metástasis hepáticas con márgenes libres.

Otro estudio, en el cual posiblemente se ha conseguido la mayor tasa de respuestas en esta enfermedad, es el comunicado en la reunión anual de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO 2007). En este estudio de fase II de primera línea de cáncer colorrectal avanzado se trató con FOLFOX-4 y cetuximab a 43 pacientes cuyo tumor o sus metástasis expresaban EGFR, logrando una tasa de respuestas confirmadas del 79% (34/43) con un 9% de respuestas completas (4/43). Diez pacientes (23%) con metástasis hepáticas previamente consideradas irresecables se sometieron a cirugía con intención curativa, en 9 de ellos se consiguió resección R0.

En la última reunión de la ASCO 2008, se presentaron nuevos análisis de 2 grandes ensayos clínicos controlados y aleatorizados en el tratamiento de primera línea del cáncer colorrectal metastásico demostrando un aumento de su eficacia en pacientes con el gen KRAS “normal”, también conocido como nativo o no mutado, este gen (presente en hasta un 65% de los pacientes con cáncer colorrectal), codifica una proteína implicada en la vía de señalización del EGFR. En los tumores con KRAS nativo o no mutado, la proteína KRAS está fuertemente regulada y sólo se activa en respuesta a

algunos estímulos como la señalización del EGFR. Cetuximab permite un bloqueo efectivo de esta señalización cuando actúa sobre el EGFR. En tumores KRAS mutado, la proteína KRAS está permanentemente “activada” por lo que se cree que la inhibición de la cascada de señalización que produce el fármaco es menos eficiente y el tumor puede continuar proliferando, creciendo y extendiéndose. Al seleccionar pacientes en base al estatus KRAS se podrían ofrecer tratamientos más personalizados, realizando un análisis genético del DNA de una muestra del tumor se podría determinar si presenta alguna de las mutaciones posibles.

### **1.1.8.- Factores pronósticos**

La principal variable que condiciona su pronóstico es el estadio en el momento del diagnóstico: los tumores limitados a la pared del colon (estadio I) tienen una supervivencia a cinco años superior al 80%, mientras que si existe enfermedad metastásica esta cifra es inferior al 5%. Por otra parte, a pesar de los innegables avances en los tratamientos quirúrgicos y oncológicos, las tasas de supervivencia en estadios avanzados no se han modificado de forma sustancial en los últimos años. En las últimas dos décadas se han realizado importantes esfuerzos para definir estrategias de cribado que permitan prevenir su aparición, mediante la detección precoz de sus lesiones precursoras (los pólipos adenomatosos), o al menos su diagnóstico en etapas tempranas asociadas a un mejor pronóstico. Por tanto el pronóstico del cáncer de colon está claramente relacionado con:

- Grado de penetración del tumor a través de la pared intestinal.

- Presencia o ausencia de afectación ganglionar.

- Metástasis a distancia.

Estas tres características constituyen la base para todo sistema de clasificación creado para esta enfermedad. La presencia de obstrucción intestinal y perforación intestinal son signos de un pronóstico precario<sup>74</sup>. Los niveles séricos elevados de antígeno carcinoembrionario antes del tratamiento tienen una significación negativa en el pronóstico<sup>75</sup>. Como ya hemos indicado, el Comité estadounidense conjunto del cáncer y un panel patrocinado por el Instituto Nacional del Cáncer recomendó que se examinaran al menos 12 ganglios linfáticos en aquellos pacientes con cáncer de colon y cáncer rectal a fin de confirmar la ausencia de implicación ganglionar a causa del tumor<sup>16, 19, 20</sup>. Esta recomendación toma en consideración que el número de ganglios linfáticos examinados es el reflejo del carácter agresivo de la disección mesentérica vascular en el momento de la resección quirúrgica y la identificación patológica de los ganglios en el espécimen. Estudios retrospectivos han mostrado que el número de ganglios linfáticos examinados durante una cirugía rectal o de colon podrían estar relacionados con los resultados del paciente<sup>21, 22, 23, 24</sup>.

En cuanto a la técnica quirúrgica, la resección laparoscópica del carcinoma de colon se asocia con un resultado a largo plazo que no es diferente del resultado de la colectomía abierta. La resección radical del segmento intestinal que contiene el tumor y que permite márgenes suficientes de resección, y la extracción de ganglios linfáticos regionales constituye el estándar de referencia en la cirugía del cáncer de colon y recto. Las tasas

de supervivencia al cabo de cinco años de la resección curativa del cáncer colorrectal varían desde casi el 100% hasta el 50% en pacientes con metástasis de ganglios linfáticos<sup>76</sup>. La evolución de la cirugía de invasión mínima permitió las resecciones colorrectales laparoscópicas, que se describieron por primera vez en 1991<sup>77, 78</sup>. Las ventajas a corto plazo de la cirugía colorrectal laparoscópica comparada con la cirugía convencional incluyen menos dolor, mejor función pulmonar, reducción de la duración del íleo postoperatorio, disminución de la fatiga y mejoría de la calidad de vida. Sin embargo, los primeros resultados a largo plazo de amplios ensayos clínicos aleatorios que compararon la cirugía laparoscópica y la cirugía abierta en la neoplasia colorrectal se publicaron muy recientemente<sup>79, 80, 81, 82</sup>. La cirugía laparoscópica para el cáncer de colon se puede considerar un procedimiento seguro, que se asocia con una tasa de supervivencia igual a la supervivencia después de la cirugía abierta<sup>79, 80</sup>. En el caso del cáncer rectal, los datos sobre el resultado a largo plazo son escasos y deben esperarse los resultados de ensayos aleatorios amplios.

Muchos otros marcadores de pronóstico se han evaluado retrospectivamente en los pacientes con cáncer de colon, aunque la mayoría, incluso la pérdida alélica del cromosoma 18q y la expresión de sintasa de timidilato, no se ha validado de manera prospectiva<sup>83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92</sup>. Se ha mostrado en una serie de población en la cual participaron 607 pacientes con cáncer colorrectal y menores de 50 años de edad que la inestabilidad de microsatélites, que también se relaciona con el cáncer colónico no polipoideo hereditario, está relacionada con mejor supervivencia, independiente del estadio del tumor<sup>93</sup>. Se han observado diferencias raciales en la supervivencia global

después de la terapia adyuvante, sin que haya diferencias en la supervivencia sin enfermedad, lo que indica que las afecciones concomitantes tienen alguna función en los resultados de supervivencia en diferentes poblaciones de pacientes<sup>94</sup>.

Después del tratamiento del cáncer del colon, las evaluaciones periódicas pueden llevar a la identificación y el manejo oportunos de la enfermedad recurrente<sup>95, 96, 97, 98</sup>. La repercusión de este tipo de observación sobre la mortalidad global de los pacientes con cáncer de colon recurrente, sin embargo, se encuentra limitada por la proporción relativamente pequeña de pacientes en los cuales se encuentran metástasis localizadas potencialmente curables. Hasta la fecha, ningún ensayo aleatorio de gran escala ha documentado la eficacia de un programa normal de vigilancia postoperatoria<sup>99, 100, 101, 102, 103</sup>. Una glicoproteína sérica que se utiliza con frecuencia en el manejo del cáncer del colon es el antígeno carcinoembrionario (CEA). Un estudio del uso de este marcador tumoral indica lo siguiente<sup>104</sup>:

- El análisis del índice de CEA no es una prueba de valor en la detección selectiva del cáncer colorrectal debido a que arroja un gran número de resultados falsos positivos y falsos negativos.
- Las pruebas postoperatorias del CEA deben restringirse a los pacientes que serían aptos para someterse a la resección de metástasis del hígado o del pulmón.
- No se debe recomendar el uso rutinario del índice de CEA para observar la respuesta al tratamiento.

No obstante, no se ha definido bien el régimen y la frecuencia de los exámenes de seguimiento óptimos porque no es manifiesta su repercusión sobre la supervivencia del paciente y la calidad de la información es inferior<sup>101, 102, 103</sup>. Nuevos métodos de vigilancia, como la inmunocentelleografía del CEA<sup>105</sup> y la tomografía de emisión de positrones (PET)<sup>106</sup> se encuentran bajo evaluación clínica.

Los estudios de PET con Fluor-desoxiglucosa (FDG) aportan una estadificación más precisa antes de intentar una resección con fines curativos. También sirven para confirmar hallazgos equívocos de estudios de imágenes convencionales previo al inicio del tratamiento. El PET no es útil para evaluar tumores pequeños de ubicación mucosa o submucosa<sup>107</sup>. Tampoco se obtendrán mayores beneficios sobre las imágenes convencionales en pacientes con enfermedad diseminada. Las imágenes de PET son claramente superiores a las imágenes obtenidas con anti-CEA para la detección de metástasis a distancia (hígado, hueso y pulmón), y de compromiso ganglionar cuando se evalúa enfermedad recurrente.

Si se considera el impacto del PET en el tratamiento, en dos estudios prospectivos se verificó un cambio en el manejo del 20% de los pacientes<sup>108</sup>.

Las indicaciones del PET en el cáncer colorrectal son las siguientes:

1- Niveles aumentados de CEA en ausencia de enfermedad recurrente detectable.

Para los pacientes con niveles elevados de CEA y sin anomalías por TC, la sensibilidad

del FDG PET se encuentra entre el 93 y el 100%, y el estudio puede detectar el tumor en dos tercios de los pacientes.

2 - Imagen de lesión dudosa en estudios convencionales (TC).

3- Detección de metástasis hepáticas y extrahepáticas en la estadificación primaria.

4- Estadificación preoperatoria antes de la resección de enfermedad recurrente.

Los pacientes seleccionados como portadores de cáncer colorrectal recurrente potencialmente resecable deberían ser sometidos a un estudio de PET preoperatorio para excluir la presencia de otros sitios patológicos.

5- Diferenciar una recurrencia local de los cambios postoperatorios.

## **1.2- Inhibidores de la COX-2. Celecoxib**

La vía del ácido araquidónico y uno de sus enzimas clave, la ciclooxigenasa (COX), o prostaglandina H sintasa, han recibido, recientemente, mucha atención con respecto al desarrollo y prevención del cáncer de colon. La ciclooxigenasa cataliza la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas y posee dos isoenzimas, COX-1 y COX-2, la última puede inducirse mediante infección o inflamación. Varios tipos tumorales sobreexpresan la COX-2 pero no la COX-1 y varias observaciones respaldan entre ellos al cáncer de colon y de otros tejidos. Se ha observado un incremento significativo de COX-2-mRNA, en la mayoría de carcinomas de colon, cuando se compara con mucosa normal circundante, así como en algunos adenomas<sup>109, 110</sup>. La expresión de COX-2 incrementada está a menudo acompañada por niveles elevados de



eicosanoides, incluyendo prostaglandinas (PG)<sup>111, 112</sup>. La COX cataliza la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas G2 y H2. La PGH2 subsecuentemente se convierte en una variedad de eicosanoides que incluyen PGE2, PGD2, PGF2 $\alpha$ , PGI2 y tromboxano (TX) A2. El tipo de PG producida varía según la maquinaria enzimática presente en el tipo celular particular. Todos los AINEs en uso clínico han demostrado inhibir la ciclooxigenasa, produciendo un marcado descenso en la producción de prostaglandinas<sup>113</sup>.

El anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) sulindac, el cual inhibe la expresión de COX, no selectivamente, causa regresión de pólipos adenomatosos en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (PAF)<sup>114</sup>. La inhibición competitiva de la actividad de COX-2 mediante agentes selectivos tales como celecoxib ha demostrado la supresión de la formación de pólipos y neoplasias en roedores con cáncer de colon inducido por carcinógeno<sup>115, 116</sup> y en neoplasia intestinal mínima (NIM) en el ratón.

Los inhibidores de la COX-2 son AINEs que han sido modificados químicamente para inhibir preferencialmente la COX-2, evitando los efectos perjudiciales tan temidos de los AINEs. Celecoxib es un inhibidor altamente selectivo de COX-2, que fue aprobado recientemente en EE.UU. como accesorio al tratamiento estándar de pacientes con poliposis adenomatosa familiar (PAF), basándose en los resultados de un ensayo multicéntrico, a doble ciego, controlado con placebo, en 77 pacientes<sup>117</sup>. De los dos niveles de dosis estudiadas durante 6 meses, se observó, mediante endoscopia, que 400 mg de celecoxib dos veces al día causaban una reducción significativa en el número de

pólipos colorrectales. Están en curso ensayos adicionales fase II/III patrocinados por el NCI, en pacientes con pólipos esporádicos y otras entidades hereditarias no polipósicas precancerosas.

Estudios preclínicos de dichos agentes<sup>118</sup> y la experiencia clínica de AINEs como sulindac<sup>114</sup> sugerirían que, probablemente, los efectos quimiopreventivos de los inhibidores altamente selectivos de COX-2 son transitorios, y que los pólipos pueden incrementarse en cuanto a tamaño y número una vez acortado el tratamiento. Se está intentando aclarar la seguridad a largo plazo.

Históricamente, los agentes quimiopreventivos han sido clasificados según su “bloqueo” o “supresión”, de acuerdo con el estadio del proceso carcinogénico en el cual interfieren. Los agentes bloqueadores ejercen su efecto en el estadio de iniciación alterando, por ejemplo, las actividades carcinógeno-metabolizadoras en tejidos diana o mediante efectos antioxidantes. Los agentes supresores actúan en estadios más avanzados del proceso carcinogénico, durante la promoción o la progresión, mediante inhibición de la proliferación celular o induciendo la apoptosis. A pesar de que actualmente se sabe que agentes únicos quimiopreventivos pueden ejercer efectos en múltiples estadios, aún no está claro si inhibidores altamente específicos, como por ejemplo inhibidores selectivos de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), o agentes con más efectos “pleiotrópicos”, como por ejemplo, los polifenoles naturales, ofrecen el mayor potencial en quimiopreención de cánceres humanos. Para contrarrestar eficazmente los procesos que llevan a una enfermedad tan multifactorial como el

cáncer, un agente quimiopreventivo satisfactorio debe poseer una variedad de propiedades anticarcinogénicas mecánicamente distintas, pero complementarias.

En general, los agentes quimiopreventivos del cáncer tienen propiedades citostáticas más que citotóxicas. Un ejemplo al respecto es el inhibidor específico de COX-2, SC-58125, el cual detenía el crecimiento de células de adenocarcinoma de colon humano que expresaban COX-2 tanto in vitro como cuando se implantaban en ratones desnudos, pero que no afectaba a las células de adenocarcinoma carentes de COX-2<sup>118</sup>. Este grado de actividad selectiva de un agente quimiopreventivo tiene una reminiscencia en el énfasis actual del desarrollo moderno de fármacos anticancerosos, sobre componentes que apuntan selectivamente a cambios en las señales celulares<sup>119</sup>. Muchas de estas “moléculas antiseñales”, a diferencia de sus fármacos anticancerosos precursores clásicos, también causan citostasis más que citotoxicidad. Estas similitudes entre agentes quimiopreventivos y quimioterápicos antiseñales dan a entender una convergencia en las filosofías que apuntalan el desarrollo de un agente nuevo en ambas áreas. Esta idea está respaldada por el hecho de que muchos objetivos de la transducción de señales celulares como ras (La activación inapropiada del gen ras ha demostrado ser una importante vía de la señal de transducción celular para la proliferación y transformación maligna de tumores), vía de la proteína quinasa activada por mitógenos y moléculas reguladoras del ciclo celular, son igualmente atractivas para las dos áreas.

### **1.3- Carcinógeno químico. Azoximetano**

Para poder llevar a cabo investigaciones sobre el cáncer, primeramente se realizaron estudios en cultivos celulares, posteriormente se pasó a inyectar subcutáneamente células tumorales a animales, para, en el momento actual, dar paso al uso de sustancias que actúan como cancerígeno en determinados animales, de manera que sea el propio animal quien desarrolle el tumor, así podríamos comparar esta situación a la de un humano expuesto a un cancerígeno (por ejemplo, el tabaco) y como consecuencia del mismo, desarrolla un cáncer de pulmón. El modelo de carcinogénesis farmacológica empleado está ampliamente aceptado en la experimentación animal para estudio del cáncer colo rectal, <sup>120, 121</sup> apareciendo alrededor del 60% de los tumores inducidos en el colon distal en una distribución similar a la que ocurre en humanos<sup>122</sup>.

Los modelos animales son, por tanto, una parte muy importante del material utilizado en la investigación del cáncer. Sin embargo, mientras determinadas patologías se desarrollan de forma espontánea en los mismos, el cáncer colorrectal es raro que se produzca.

Antes de 1965 no había modelo animal de cáncer colorectal satisfactorio. Todos los estudios que se habían realizado hasta entonces (Lorenz<sup>123</sup>, Walpole<sup>124</sup>...) llegaban a la conclusión de que el desarrollo de cáncer colorectal en ratas era realmente raro. Sin embargo, Laqueur y Spatz<sup>125</sup>, estudiando en 1962 el efecto neurotóxico de la ingestión de “cycasin” (sustancia encontrada en determinadas nueces de unas islas del Pacífico) vieron que los animales que la tomaron durante seis o siete meses, desarrollaban

múltiples cánceres intestinales. Laqueur se interesó en este efecto carcinogénico y desarrolló importantes estudios sobre el cáncer intestinal en animales (Laqueur<sup>126</sup>).

Druckrey<sup>127</sup>, en 1970, estudió el efecto carcinogénico de la 1,2-dimetilhidracina (DMH), precursor del azoximetano, y vio que era un carcinogénico intestinal efectivo y altamente específico en ratas, sobre todo administrado subcutáneamente. DMH es uno de los carcinógenos químicos más efectivos que induce cáncer de colon en el 80 a 100% de las ratas, entre 5 y 7 meses posteriores al inicio del tratamiento<sup>128</sup>. DMH es un procarcinógeno, ya que requiere activación metabólica dentro del organismo para formar el carcinógeno activo. Dicha activación incluye primeramente su oxidación a azometano, una segunda oxidación convierte el azometano a azoximetano, el cual es luego N-hidroxilado a metilazoximetanol. El metilazoximetanol es muy inestable, siendo descompuesto espontáneamente “in vitro” en formaldehído, agua y nitrógeno<sup>122</sup>. Durante esta descomposición se forma un agente alquilante, el metildiazonio, el cual genera un ión carbónico capaz de metilar ADN, ARN y proteínas<sup>129</sup>.

Posteriores estudios con DMH<sup>120, 130</sup>, demuestran la fiabilidad y consistencia de la misma como inductor de cáncer colorectal en ratas.

Ahora bien, su importancia y utilidad radica en que garantiza un cáncer colorectal experimental como modelo de enfermedad humana. Así Gilbert<sup>121</sup> demuestra la similitud macroscópica, microscópica y clínica entre el cáncer colorrectal inducido experimentalmente con DMH en ratas y el humano.

Por todo ello, y debido a la dificultad que entraña la realización de un estudio prospectivo en humanos, parece útil desarrollar un modelo experimental con ratas a las que se les induzca el cáncer con Azoximetano, ya que se ha demostrado que es superponible, tanto macroscópica como microscópicamente y en su comportamiento clínico, al humano.

## **2.- Planteamiento del problema**

### **2.1- Antecedentes y estado actual**

Diversos estudios epidemiológicos y trabajos de investigación de laboratorio (más de 100) han apoyado la hipótesis que los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) reducen el riesgo de padecer un cáncer colorectal<sup>116, 131, 132, 133, 134, 135, 136</sup>. Se han publicado numerosos estudios que evalúan los AINE en la quimioprevención del cáncer colorectal farmacológicamente inducido en modelos animales, mostrando que los AINE reducen la incidencia y la multiplicidad de estos tumores<sup>135, 137</sup>.

Por otra parte esta inhibición de la carcinogenesis de colon por AINE es mediada por la modulación en la producción de prostaglandinas por las enzimas ciclooxigenasas (COX)<sup>138</sup>.

La COX cataliza los primeros pasos en la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Existen dos isoformas de COX, como hemos comentado anteriormente, la COX-1 que es constitutiva, está expresada siempre en todos los tejidos, y la COX-2 que es inducible por varios estímulos, generalmente asociados con la inflamación aguda o crónica<sup>139, 140, 141</sup>.

La COX-2 se identificó inicialmente como un gen de contestación de crecimiento inmediato-temprano. La sobreexpresión de la COX-2 ha sido observada en el 85-90 % de los tumores de colon<sup>142, 143</sup> considerándose que los de COX-1 permanecen inalterados, por lo que los inhibidores específicos de la COX-2 podrían servir como agentes quimiopreventivos<sup>115, 117, 144</sup>.

La COX-2 también está sobreexpresada en los pólipos colónicos humanos (50% en los adenomas de colon) y en los macrófagos que se encuentran en íntimo contacto con estos pólipos esporádicos, aumentando sus niveles a medida que crece el adenoma y estando presente en prácticamente la mayoría de los adenocarcinomas<sup>142, 143</sup>.

Además un estudio reciente demostró un 40% de disminución de la formación de criptas aberrantes y una significativa disminución en la multiplicidad tumoral en ratas inducidas con carcinógenos tratadas con un inhibidor COX-2<sup>145, 146</sup>. Mientras que la expresión de la COX-1 que se produce constante e independientemente del entorno permanece igual o disminuída<sup>142, 145</sup>.

El crecimiento de las células cólicas tumorales que expresan COX-2 puede ser inhibida “in vitro” e “in vivo” con el tratamiento con inhibidores COX-2<sup>147, 148</sup>. Estos estudios han revelado que la inhibición de este crecimiento resulta de un efecto antiangiogénico, antiproliferativo y proapoptótico<sup>147, 148, 149, 150, 151</sup>.

En los últimos años el conocimiento y estudio respecto al papel potencial de la enzima COX-2 se ha extendido a otras enfermedades distintas para las que primariamente se aprobaron, a saber artritis reumatoide y artrosis (FDA).

La carcinogénesis cólica con Azoximetano induce la formación de criptas aberrantes en el epitelio intestinal y promueve el desarrollo tumoral tras su inducción. El epitelio displásico y neoplásico sobreexpresa la COX-2, y esta enzima inhibe la apoptosis y promueve la angiogénesis, por lo que la inhibición de la COX-2 podría frenar la inducción y el desarrollo de los tumores inducidos. Esta sobreexpresión de la COX-2 observada en tumores cólicos se ha constatado en numerosos estudios que han aislado la enzima en el estroma y en el epitelio de adenomas cólicos y del cáncer colorectal<sup>152, 153</sup>, relacionando algunos autores incluso la intensidad de expresión de la COX-2 con la supervivencia<sup>110, 154</sup>. La actividad COX-2 parece por tanto relacionada con la proliferación neoplásica en criptas aberrantes del colon, por inhibir la apoptosis o muerte celular programada de las células tumorales, por frenar la función de los linfocitos T-NK ("natural killer") y por favorecer la expansión tumoral induciendo como hemos comentado la angiogénesis en el tumor<sup>155</sup>. La COX-2 es inducible por oncogenes ras y scr, interleukina-1, hipoxia, benzopireno, luz ultravioleta, factor de



crecimiento epidérmico y factor de necrosis tumoral alfa. La dexametasona, sustancias antioxidantes y la proteína p53 suprimen la expresión de la COX-2. La isoenzima COX-2 sintetiza prostaglandina E2 (PGE2) que inhibe la apoptosis y se asocia con la aparición de metástasis tumorales. Además, induce la interleukina-6 (IL-6) que se relaciona con la invasión de las células cancerosas y la haptoglobina, que estimula la angiogénesis y la implantación de dichas células.

La enzima además se expresa concretamente en los adenomas hallados en los ratones con el gen mutante APC (Adenomatous poliosis coli, poliposis adenomatosa cólica), el tratamiento de estos ratones con un inhibidor específico de la COX-2 disminuyó significativamente (de forma dosis dependiente) el número de pólipos<sup>156, 157</sup>. Precisamente la primera evidencia de la eficacia de estos inhibidores de COX-2 en animales se debe a estudios realizados sobre estos ratones denominados Min (multiple intestinal neoplasia), con una mutación dominante del gen APC, que desarrolla múltiples adenomas intestinales<sup>158</sup>. La administración de celecoxib frente a piroxicam y la de rofecoxib producen una disminución del número de adenomas<sup>157, 158, 159, 160</sup>. En modelos de carcinogénesis con ratas expuestas a azoximetano, se redujeron los focos aberrantes de las criptas del colon (lesión precursora de adenomas colónicos) en un 40-49%, si se administraba celecoxib, así como la incidencia de cáncer colorectal y su multiplicidad en los animales expuestos al carcinógeno y tratados con celecoxib<sup>115, 116, 161, 162</sup>.

En los pacientes con poliposis familiar, con patrón de herencia autosómico dominante y expresividad variable (afecta a 1 de cada 8000), el tratamiento con AINE induce la regresión de los pólipos existentes<sup>117, 163, 164, 165</sup>. De no ser así, sin resección quirúrgica profiláctica, posiblemente desarrollarían cáncer hacia los 50 años.

## **2.2- Hipótesis de trabajo**

Existen básicamente dos estrategias para la prevención del cáncer colorrectal, la detección precoz de la enfermedad y la quimioprevención.

El tratamiento precoz de las lesiones precancerosas y del cáncer establecido reducen la incidencia y mortalidad del cáncer colorectal<sup>166, 167, 168</sup>. La quimioprevención es el uso de agentes químicos para prevenir el desarrollo del proceso de carcinogénesis, entre ellos se han propuesto algunos fármacos como los inhibidores de la enzima ciclooxigenasa.

Existe una evidencia creciente que sugiere que el ácido acetilsalicílico (AAS) y otros antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) reducen el riesgo de padecer cáncer colorrectal. Los estudios realizados sobre la poliposis cólica familiar establecen que el proceso de formación de pólipos cólicos se ve afectado por los AINEs, detectando una

reducción del riesgo de padecer cáncer colorrectal cuando se emplea de manera crónica AAS u otros AINEs. El mecanismo molecular responsable de la quimioprevención no está perfectamente establecido y se debería establecer la dosis, duración y frecuencia de administración de estos fármacos para conseguir una actividad preventiva para el cáncer colorrectal<sup>169</sup>.

Dado el número de estudios epidemiológicos que establecen la posibilidad de inhibir la tumorigénesis colorectal utilizando AINEs, pensamos que la utilización de inhibidores específicos de la isoforma COX-2<sup>170</sup> puede aumentar este efecto inhibitorio, además, la utilización previa al impacto del factor tumorigénico inducido por Azoximetano puede incrementar este efecto beneficioso.

Se trata pues de un estudio experimental con animales de laboratorio (ratas de raza Wistar), distribuida en varios grupos, en las que se inducirá un tumor colo-rectal mediante la administración de un carcinógeno químico (Azoximetano). Utilizamos el inhibidor específico de la COX-2, Celecoxib, en distintas fases del proceso carcinogénico, para observar al final del estudio (semana 52) el posible efecto inhibitorio sobre el proceso tumoral inducido por Azoximetano.

## **2.3- Objetivos concretos**

Como hemos comentado se ha comprobado a nivel clínico y experimental la existencia de sobreexpresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en los tumores de colon, por lo que los inhibidores de dicha enzima podrían tener un efecto preventivo. El objetivo del estudio es investigar el efecto de la inhibición de la ciclooxigenasa en un modelo de carcinogénesis cólica farmacológica en la rata.

Nos planteamos pues los siguientes objetivos concretos:

**1** -Estudio de la inhibición de la tumorigénesis del cáncer colo-rectal mediante la utilización del inhibidor de la COX-2, Celecoxib, en distintas fases de la misma.

**2** -Determinación de las formas anatomopatológicas de presentación del cáncer colo-rectal en el animal de experimentación tras la inducción de tumorigénesis con Azoximetano y su posible modificación cualitativa mediante la inhibición de la misma con la utilización de Celecoxib.

**3** -Establecer las bases de la importancia epidemiológica de la utilización de AINE en la prevención del cáncer colo-rectal.

### **3.- Material y Métodos**

#### **3.1- Material**

##### **3.1.1.- Laboratorio**

Para el desarrollo de este estudio experimental se utilizó el animalario de la Facultad de Medicina de Sevilla. En el mismo se habilitó una dependencia para ubicar todas las ratas del estudio, así como espacio y material necesario para manipulación de jaulas y animales junto con todas las tareas necesarias a lo largo del estudio (pesado de animales, administración de fármacos, etc).

La temperatura ambiente de la dependencia se encontraba entre 23°C y 26°C, mediante sistema de aire acondicionado y un grado de humedad entre el 40% y el 60%.

Las laparotomías de los animales, realizadas al finalizar el estudio, se desarrollaron en el quirófano experimental (situado en una dependencia contigua), donde se trasladaban las ratas inmediatamente después de ser sacrificadas.

El personal habitual de mantenimiento del laboratorio se encargó de la alimentación periódica de los animales, a demanda, mediante pienso especial para ratas, así como de la limpieza periódica de las jaulas e instalaciones.

Del agua de bebida, administrada de la red de abastecimiento y ad libitum, nos encargamos los investigadores debido a la manipulación que requería la misma para la administración del Azoximetano y del Celecoxib diario durante todo el estudio.

### **3.1.2.- Animales**

Se utilizaron ratas de laboratorio raza wistar con 2,5 meses de edad aproximadamente, criadas en el propio animalario de la Facultad de Medicina. El número total de ratas fue de 88, 44 machos y 44 hembras, que se distribuyeron en 3 grupos de 26 ratas, (cada uno con 13 machos y 13 hembras) y un grupo 4 de control con 10 ratas (5 machos y 5 hembras).

El número total de jaulas (de 35 cm de ancho x 60 de largo y 20 de alto) fue de 20, conteniendo cada una entre 4 y 5 animales de la siguiente forma: en los grupos 1, 2 y 3 tanto los machos como las hembras se dispusieron en cada grupo en 2 jaulas de 4 animales y una jaula de 5. El grupo 4 de control al contener sólo 10 animales se distribuyó en 1 jaula de 5 machos y otra de 5 hembras. Esta distribución obedece a la temporalidad en la administración de los fármacos. (Tabla 1)

GRUPOS	JAULAS HEMBRAS			TOTAL	JAULAS MACHOS			TOTAL	TOTAL GRUPOS
	<b>1</b>	4	4	5	13	4	4	5	13
<b>2</b>	4	4	5	13	4	4	5	13	<b>26</b>
<b>3</b>	4	4	5	13	4	4	5	13	<b>26</b>
<b>4 control</b>	5			5	5			5	<b>10</b>
	<b>TOTAL</b>			<b>44</b>	<b>TOTAL</b>			<b>44</b>	<b>88</b>

**Total ratas:**

88 en 3 grupos de 26 (13 machos y 13 hembras)  
+  
Grupo control de 10 (5 machos y 5 hembras)

**Grupos:**

**1 y 2** - Celecoxib  
**3** - Azoximetano  
**4 control** - Sólo agua

**Tabla 1 – Distribución Jaulas**

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

Debido a que el estudio se inició con animales de unos 2,5 meses de edad y dada la duración del proyecto (52 semanas), el crecimiento de estos hizo necesario controlar el consumo de agua (el Celecoxib se administró disuelto en ella), y el peso de los mismos hasta su estabilización (semana 21 del estudio).

### **3.1.3.- Azoximetano**

También conocido como AOM, azoxymethane, diazene, dimethyl-1-oxide (9CI).

Fue el carcinógeno químico utilizado<sup>171, 172, 173</sup> adquirido previa solicitud a laboratorios Sigma-Aldrich. El producto de fórmula  $C_2H_6N_2O$  y peso molecular 74,08 venía en ampollas de vidrio protegidas de la luz y con 0,1 ml de producto con una pureza de 0,991 gr/ml, soluble en agua, etanol y éter, peso específico 0,991, punto de ebullición entre 97°C y 99°C y de aspecto líquido.

### **3.1.4.- Celecoxib**

El Celecoxib utilizado para el estudio fue el producto comercial Celebrex<sup>R</sup> de laboratorios Pfizer y dispensación en farmacias para uso humano, aprobado para el tratamiento de artrosis y artritis, que se presenta en cajas de 30 cápsulas conteniendo cada una 200 mg de Celecoxib. No es soluble en agua (solubilidad 5 microg/ml) y si lo es en etanol (solubilidad 111 mg/ml), estas circunstancias hacen que requiera una manipulación especial para poder administrárselo diariamente a las ratas en el agua de bebida a las dosis correctas.

### **3.1.5.- Material anestesia y material auxiliar**



Durante el estudio ha sido necesaria la manipulación individual de las ratas en varias ocasiones:

- Para pesarlas.
- Para la administración de las distintas dosis de Azoximetano.
- Para el sacrificio al final del estudio.

Estas operaciones había que realizarlas con la rata dormida por lo que se hizo necesario un método anestésico.

Se utilizó una caja de material rígido y transparente en forma de cubo abierta por la parte superior y con tapadera, en la que se introducía la rata una a una para dormirla, el producto utilizado para la anestesia fue éter sulfúrico.

Igualmente se utilizó material complementario de laboratorio para la preparación de fármacos:

- Etanol, vaso de precipitados, probeta, varilla de vidrio y varios recipientes de plástico de 2 litros de capacidad con cierre hermético para la realización de las diluciones.
- El agua final de bebida obtenida, ya con el Celecoxib en disolución, se almacenaba en 2 recipientes de 25 litros de capacidad cada uno (uno para los machos y el otro para las hembras).
- Jeringas de insulina para la administración del Azoximetano y suero fisiológico para su preparación, la manipulación de este, dada su toxicidad, requirió el uso de material adecuado de protección (gafas protectoras contra productos químicos, guantes compatibles resistentes, vestimenta protectora y sistema mecánico de escape de humos).

### **3.1.6.- Material Quirúrgico**

El material quirúrgico utilizado se empleó para las laparotomías y preparación y extracción de piezas de las ratas en el quirófano experimental del animalario. Se utilizaron: Bisturís, tijeras, guantes desechables, gasas, suero fisiológico, paños de campo operatorio, formol tamponado al 10% y recipientes con cierre hermético para guardar las piezas de colectomía.

También se utilizó equipo de fotografía con objetivo macro para tomar fotos de las muestras.

## **3.2- Métodos**

### **3.2.1.- Temporalidad del estudio**

La duración total del estudio ha sido de 52 semanas (1 año). Dado los objetivos perseguidos, es decir observar la efectividad del Celecoxib durante el estado de progresión de la carcinogénesis<sup>133</sup> y comprobar su efecto inhibitor tras la inducción por carcinógeno químico<sup>131, 138</sup>, la administración de los fármacos se ha realizado en distintas fases a cada grupo durante el desarrollo del proyecto:

**-Grupo 1**, recibió Celecoxib desde la semana 1 (inicio del estudio) hasta el final del mismo, semana 52, todos los días. Igualmente se le administró Azoximetano en 3 ocasiones y en una sola dosis en las semanas 2, 9 y 10 del estudio.

**-Grupo 2**, se le comenzó a administrar Celecoxib en la semana 7 del estudio y hasta el final del mismo diariamente. La administración de Azoximetano se realizó, al igual que en el grupo anterior, en una sola dosis, en las semanas 2, 9 y 10 del estudio.

**-Grupo 3**, no recibió Celecoxib. A este grupo sólo se le administró Azoximetano en las mismas dosis y periodos que a los grupos 1 y 2, es decir semanas 2, 9 y 10 del estudio.

**-Grupo 4 ó control**, no recibió ningún fármaco, solamente pienso y agua de bebida.

<b>N° Semanas</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3 sólo Azoximetano</b>	<b>Grupo 4 sólo agua</b>
<b>1</b>	<b>-Inicio con Celecoxib hasta semana 52</b> -Pesado	-Pesado	-Pesado	-Pesado
<b>2</b>	<b>-Azoximetano</b> -Pesado	<b>-Azoximetano</b> -Pesado	<b>-Azoximetano</b> -Pesado	-Pesado
<b>5</b>	-Pesado	-Pesado	-Pesado	-Pesado
<b>7</b>	-Pesado	-Pesado <b>-Inicio con Celecoxib hasta semana 52</b>	-Pesado	-Pesado
<b>9</b>	-Pesado <b>-Azoximetano</b>	-Pesado <b>-Azoximetano</b>	-Pesado <b>-Azoximetano</b>	-Pesado
<b>10</b>	<b>-Azoximetano</b> -Pesado	<b>-Azoximetano</b> -Pesado	<b>-Azoximetano</b> -Pesado	-Pesado
<b>13</b>	-Pesado	-Pesado	-Pesado	-Pesado
<b>17</b>	-Pesado	-Pesado	-Pesado	-Pesado
<b>21</b>	-Pesado	-Pesado	-Pesado	-Pesado
<b>52</b>	<b>sacrificio</b>	<b>sacrificio</b>	<b>sacrificio</b>	<b>sacrificio</b>

**Tabla 2 - Temporalidad estudio**

En esta tabla se puede ver de forma representativa la temporalidad del proyecto con la administración de los distintos fármacos.

Al final de las 52 semanas los animales fueron sacrificados para analizar los resultados.

### **3.2.2.- Preparación y administración de fármacos**

#### **3.2.2.1.- Pesos y consumo de agua**

Ya se ha comentado la necesidad de controlar el peso de las ratas para calcular las dosis de fármacos, tanto de Celecoxib como de Azoximetano. Este control se realizó en 9 ocasiones en todos los grupos, el procedimiento fue el mismo descrito para la administración de Azoximetano.

La evolución de los pesos fue progresiva durante las primeras 13 semanas, a partir de aquí se estabilizó, obteniendo resultados similares a partir de la semana 21. No hubo diferencias significativas entre los grupos. (Tabla 3)

El control del consumo de agua fue necesario para calcular la dosis correcta de Celecoxib.

Este parámetro fue calculado desde el día 1 a todos los grupos, independientemente del momento de inicio con Celecoxib, incluido el grupo control, con lo cual obteníamos una población más amplia.

Semanas	Media Pesos Machos (gr.)	Media Pesos Hembras (gr.)
1	508	276
2	525	280
5	550	295
7	565	300
9	580	304
10	585	308
13	600	312
17	605	314
21	606	314

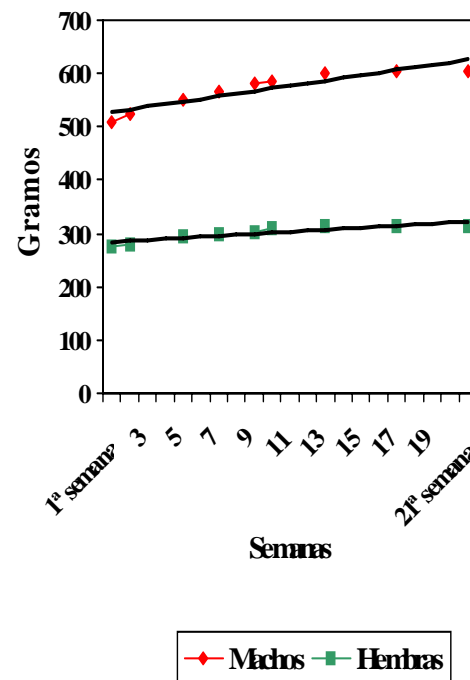
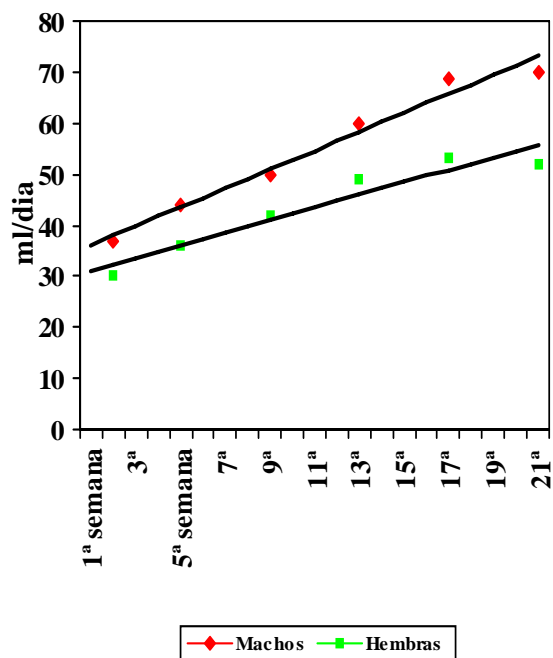


Tabla 3 – Peso medio por semanas

El proceso consistió en comenzar llenando todos los recipientes de las jaulas al inicio y a partir de aquí anotar la fecha y el volumen repuesto en cada ocasión en cada bote, para posteriormente calcular la cantidad de agua consumida diariamente. No se observaron diferencias significativas en el consumo de agua entre los distintos grupos.

Estos controles se realizaron hasta la semana 21, en la que al igual que con los pesos, los datos se estabilizaron. (Tabla 4)

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



**Tabla 4 - Consumo medio de agua por semanas**

Estos cálculos de pesos y consumo de agua prácticamente no se vieron afectados por la mortalidad durante el estudio, ya que aunque esta fue elevada, la primera muerte se registró en la semana 14 (una hembra del grupo 2) y la siguiente en la semana 26 (hembra del grupo 1), incrementándose significativamente a partir de aquí.

### **3.2.2.2.- Administración de Celecoxib**

Utilizamos el producto comercial Celebrex<sup>R</sup> cuya presentación es en cajas de 30 cápsulas conteniendo cada una de ellas 200 mg de Celecoxib. Esta presentación requirió una preparación para su administración diaria a las ratas.

La dosis de Celecoxib que hemos utilizado fue de 9mg/Kg./día.

El Celecoxib no es soluble en agua (solubilidad de 5 microgramos/ml), pero si lo es en etanol (solubilidad de 111mg/ml) por lo que se optó por utilizar este solvente para su posterior disolución en el agua de bebida.

Hubo que tener en cuenta 3 cuestiones fundamentales, ya descritas, a la hora de preparar el Celecoxib:

#### **- Peso de las ratas.**

Se partió de animales con 2 meses de edad, por lo que el rápido crecimiento durante las primeras semanas del estudio hizo necesario controles repetidos de peso (Tabla 3) para modificar las dosis de Celecoxib.

#### **- Consumo del agua de bebida.**

Al igual que con el peso estos cálculos fueron necesarios para una correcta dosificación del Celecoxib. Se produjo un incremento en el consumo durante las primeras semanas, periodo de crecimiento, y con diferencias entre machos y hembras. (Tabla 4)



**- Preparación del Celecoxib en el agua de bebida.**

Partimos de una cápsula de Celebrex<sup>R</sup> conteniendo 200 mg de Celecoxib.

A partir de aquí creamos 3 diluciones distintas:

**A-** Disolución que resulta de disolver el contenido de la cápsula en alcohol absoluto.

Los 200 mg de Celecoxib se disuelven en 10 ml de etanol, lo que da una concentración de 20mg/ml o 20000mg/litro (máximo 111mg/ml).

**B-** Disolución hidro-alcohólica o solución madre, que resulta de diluir la dilución A con agua hasta 1 litro. Es decir:

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

Donde:

- V<sub>a</sub>** es el volumen de la dilución **A** (0,01 litro).
- C<sub>a</sub>** es la concentración en celecoxib de la dilución **A** (20000 mg/l)
- V<sub>b</sub>** es el volumen de la dilución **B** hidro-alcohólica o solución madre (1 litro)
- C<sub>b</sub>** es la concentración de la dilución **B** hidro alcohólica (200 mg/l)

En el caso que nos ocupa y despejando **C<sub>b</sub>** de la igualdad anterior, sería:

$$C_b = V_a \times C_a / V_b = 0,01 \times 20000 / 1 = 200 \text{ mg/litro}$$

C- Agua de bebida de la rata, la solución madre obtenida anteriormente (**B**) es la que hay que agregar a cada litro de agua de bebida, teniendo en cuenta el peso de la rata y el consumo medio diario de agua.

C1- Inicio del estudio. Semana 1: Los cálculos dieron un consumo de agua medio de 37 ml /día para los machos y 30 ml/día para las hembras. El peso medio de los machos fue de 508 gr y el de las hembras de 276 gr. Dosificando el Celecoxib a 0'9 mg/kg/día y teniendo en cuenta el peso y el consumo de agua descritos nos da una dosificación de Celecoxib diaria inicial de 0,457 mg para los machos (contenidos en los 37 ml de consumo diario de agua) y de 0,248 mg para las hembras (contenidos en los 30 ml de consumo diario de agua).

La cantidad de solución madre a agregar a cada litro de agua de bebida fue 61,80 ml para los machos y de 41,36 ml para las hembras.

Por tanto cada litro de agua de bebida contienen 12,36 mg de Celecoxib para los machos y 8,28 mg para las hembras. (Tabla 5)

	Dosis mg/peso rata	Concentración de Celecoxib en mg/litro agua de bebida	Solución madre (ml) en 1 litro agua de bebida
<u>Machos</u> : 508 gr peso y 37 ml agua/día	<b>0,4572</b>	<b>12,36</b>	<b>61,80</b>
<u>Hembras</u> : 276 gr peso y 30 ml agua/día	<b>0,2484</b>	<b>8,28</b>	<b>41,36</b>

**Tabla 5 - Dosis Celecoxib semana 1 (inicio estudio)**

Al disponer de recipientes de 25 litros, uno para las hembras y otro para los machos, se podía preparar el agua de bebida en mayor cantidad, volviendo a prepararla cuando se necesitaba, entre 9 y 15 días aproximadamente; a partir de estos recipientes se rellenaban los bebederos de 1 litro dispuestos en cada jaula.

De acuerdo con el crecimiento de las ratas, la preparación de las diluciones hubo que adaptarlas al mismo, debido al incremento de peso y al consumo de agua los cálculos y controles se realizaron en 9 ocasiones, a saber en las semanas 1, 2, 5, 7, 9, 10, 13, 17 y 21, modificando las diluciones según indicaban los datos en cada control y de la misma forma ya comentada.

En las semanas 17 y 21 los datos de peso y consumo de agua se estabilizaron debido a la estabilidad en el crecimiento, por lo que estos datos se mantuvieron hasta el final del estudio.

C2- Semanas 17 y 21. Estabilización de pesos y consumo de agua. (Tabla 6)

	Dosis mg/peso rata	Concentración de Celecoxib en mg/litro agua de bebida	Solución madre (ml) en 1 litro de agua de bebida
<u>Machos:</u> 606 gr peso y 70 ml agua/día	<b>0,5454</b>	<b>7,79</b>	<b>38,95</b>
<u>Hembras:</u> 314 gr peso y 52 ml agua/día	<b>0,2826</b>	<b>5,43</b>	<b>27,17</b>

**Tabla 6 - Dosis Celecoxib semanas 17 y 21 (estabilización de pesos)**

**3.2.2.3.- Administración de Azoximetano**

La presentación del Azoximetano como hemos comentado anteriormente es en ampollas de vidrio protegidas de la luz y con un contenido de 0,1 ml de Azoximetano de pureza 0,991 gr/ml, soluble en agua y etanol. La mínima cantidad de producto contenido en la ampolla hacia difícil su manipulación y dosificación directa, por lo que se procedió a diluir el contenido de cada ampolla en 9,9 cc de suero fisiológico obteniendo una disolución de 10 cc conteniendo 100 mg de Azoximetano. La dosis utilizada fue de 15 mg /kg/dosis, lo que suponía 1,5 cc/kg/dosis de la dilución creada. La administración del producto se realizó en tres ocasiones, semanas 2, 9 y 10 y siempre a la misma dosis (15 mg/kg), utilizando los datos de controles de peso para una correcta dosificación. Estos cálculos se realizaron individualmente a cada rata permitiendo

individualizar la dosis a cada animal en cada una de las 3 ocasiones a diferencia del Celecoxib en el que se utilizó la media de pesos de cada sexo para la administración diaria en el agua de bebida durante todo el estudio.

El procedimiento de administración de Azoximetano se estandarizó en las 3 ocasiones en 3 fases de la siguiente forma:

- A- Manipulación y anestesia de los animales.
- B- Pesado y calculo de dosis a administrar.
- C- Administración del Azoximetano.

Se utilizaron jeringas y aguja de insulina para la inyección del Azoximetano por vía subcutánea en región interescapular<sup>103</sup>.

Con esta estandarización conseguimos:

- Diversificar las tareas para evitar administraciones dobles o nulas.
- Evitar errores en los cálculos de dosis.
- Evitar excesiva manipulación y posible contacto con el Azoximetano dada su toxicidad.
- Evitar sobredosificación de anestésico que podría conducir a la muerte del animal.

Para el pesado se utilizó una balanza electrónica de laboratorio. Tanto el control de pesos como de consumo de agua se realizaron en los 4 grupos cada vez.

La cantidad total de Azoximetano utilizado se recoge en las siguientes tablas:

	Peso total del animal (gr)	Azoximetano (mg)	Ampollas azoximetano
Machos	<b>18720</b>	<b>280,8</b>	<b>2,81</b>
Hembras	<b>10900</b>	<b>163,5</b>	<b>1,63</b>
<b>Total</b>	<b>29620</b>	<b>444,3</b>	<b>4,44</b>

**Tabla 7 – 1ª Dosis de Azoximetano**

	Peso total del animal (gr)	Azoximetano (mg)	Ampollas azoximetano
Machos	<b>20495</b>	<b>307,425</b>	<b>3,07</b>
Hembras	<b>11990</b>	<b>179,850</b>	<b>1,79</b>
<b>Total</b>	<b>32485</b>	<b>487,275</b>	<b>4,86</b>

**Tabla 8 – 2ª Dosis de Azoximetano**

	Peso total del animal (gr)	Azoximetano (mg)	Ampollas azoximetano
Machos	<b>21250</b>	<b>318,75</b>	<b>3,18</b>
Hembras	<b>12300</b>	<b>184,5</b>	<b>1,84</b>
<b>Total</b>	<b>33550</b>	<b>503,25</b>	<b>5,02</b>

**Tabla 9 – 3ª Dosis de azoximetano**

### **3.2.3.- Métodos anestésicos**

Era necesario disponer de un sistema rápido y fácil de anestesia para poder manipular a las ratas en varias ocasiones durante el estudio:

- Para pesarlas y administrarles el Azoximetano, en total en 9 ocasiones.
- Para el sacrificio final, en la semana 52 a los ejemplares que quedaron

vivos.

El material utilizado como ya se ha comentado consistió en un recipiente en forma de cubo, transparente, de unos 20 cm de altura abierto y accesible por la parte superior con tapadera. El fondo del recipiente se tapizó de algodón y se impregnaba con éter. Para anestesiarse a la rata se introducía esta en el recipiente y se tapaba, observándola hasta que quedaba dormida e inmóvil momento en el cual se sacaba para realizarle la oportuna operación. El tiempo que tardaba la rata en quedarse dormida variaba de unos

ejemplares a otros (entre 15 y 30 segundos) esto permitía una anestesia entre unos 30 y 45 segundos, aunque hubo casos de despertar precoz, éste era de forma gradual y no hubo que lamentar ninguna muerte accidental por exceso de anestésico. En la semana 52 al concluir el estudio se utilizó esta fórmula para el sacrificio con la única diferencia de que se dejaba más tiempo al animal en la caja hasta que fallecía para proceder posteriormente a la laparotomía.

### **3.2.4.- Métodos quirúrgicos. Obtención de muestras**

Esta fase del estudio se realizó en el quirófano experimental del animalario. Una vez sacrificadas las ratas en la semana 52 se trasladaban inmediatamente hasta dicho quirófano anotando número de animal, grupo y sexo. Se procedía a realizarles una incisión media tóraco-abdominal mediante bisturí y tijeras desde el cuello hasta el ano; tras observar y anotar estado de las vísceras y presencia o no de adenopatías se procedía a extirpar el colon terminal desde válvula íleo-cecal hasta ano. El colon así obtenido se abría en sentido longitudinal por borde antimesentérico y se limpiaba con agua corriente para observar la presencia de tumores o pólipos a nivel macroscópico.

Tras fijar las muestras en formol tamponado al 10% se trasladaban a Anatomía Patológica para su análisis indicando en el recipiente la numeración e identidad del animal de procedencia, es decir, un primer número que correspondía al ordinal del animal, seguido de una letra M o H (Macho o Hembra), y a continuación otro número (1, 2, 3 ó 4) que indicaba el grupo al que pertenecía.



### **3.2.5.- Métodos anatomopatológicos**

En total el número de ratas que sobrevivió al estudio fue de 55, de las cuales se obtuvieron un total de 71 muestras, de ellas 20 correspondieron al grupo 1 (14 ratas), 24 al grupo 2 (16 ratas), 18 al grupo 3 (16 ratas) y 9 al grupo 4 (9 ratas), ver tabla 10.

Grupos	Nº animales que finalizaron el estudio	Muestras obtenidas
1	14	20
2	16	24
3	16	18
4	9	9
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>71</b>

**Tabla 10 - Muestras obtenidas al finalizar el estudio.**

A los animales muertos durante el estudio no se les realizó estudio postmortem por presentar alto grado de autólisis visceral generalizada.

La identificación de los animales sacrificados al final del estudio se realizó, como ya se ha comentado anteriormente, con 3 siglas: la primera corresponde con el número de

animal, la segunda es una letra H (hembra) o M (macho) y la tercera un número 1, 2, 3 ó 4 correspondiente a cada grupo.

Una vez sacrificadas las ratas se procedió por una parte a la resección del colon en su totalidad, es decir, desde válvula ileocecal hasta canal anal. Posteriormente se practicó un estudio postmortem del animal, con objeto de observar si existían nódulos metastáticos en otras localizaciones.

El colon se abrió por el borde antimesentérico, se contabilizaron las lesiones tumorales y se procedió a su procesamiento y posterior inclusión en parafina.

Exactamente el mismo procedimiento se realizó con el resto de órganos para el estudio postmortem.

Las piezas de colectomía, una vez abiertas, se lavaron en agua corriente y se extendieron en un corcho con alfileres para observar toda la superficie mucosa.

Una vez extendidas las piezas eran introducidas en una vasija con formol tamponado al 10% durante 48 horas. Posteriormente estas piezas de colectomía eran lavadas otra vez en agua corriente y talladas tanto las lesiones tumorales invasivas como las no invasivas y la mucosa adyacente. Las piezas tumorales se incluían en su totalidad.

En cuanto al estudio multiorgánico postmortem, las piezas se fijaron en el mismo tipo de formol tamponado durante el mismo tiempo y se estudiaron solamente las zonas más representativas o sospechosas de lesión (en total se obtuvieron 71 muestras).

La metodología utilizada en cada caso, es decir las piezas de colectomía y el estudio postmortem fue el mismo.

La sistemática para el estudio microscópico fue en primer lugar la inclusión en hematoxilina-eosina. Posteriormente en los tumores cólicos se realizaron además técnicas histoquímicas para el estudio de mucinas (Azul Alciano -AA- a ph 2'5). En los pólipos no se realizaron técnicas especiales, tampoco se efectuaron en las muestras escogidas en los diferentes órganos para el estudio postmortem.

La metodología seguida para la tinción histoquímica del AA fue la siguiente:

- 1- Los cortes histológicos de 4 micras de espesor fueron introducidos en estufa a 37° para conseguir desparafinar los mismos.
- 2- Se pasaron los cortes histológicos a 2 xiloles consecutivos durante 10 minutos cada uno.
- 3- Se pasaron a alcoholes decrecientes y finalmente al agua destilada.
- 4- Se aplicó el colorante Azul Alciano (AA) a ph 2'5 durante 10 minutos.
- 5- Se lavó con agua destilada.
- 6- Se montaron y cubrieron.

Los cortes histológicos se observaron en un microscopio Zeiss y se contabilizaron para su posterior evaluación.

### **3.2.6.- Métodos estadísticos**

Todos los datos obtenidos han sido introducidos en una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2003 para su posterior procesamiento. El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS Win V12.0.

La comparación estadística de las variables cuantitativas y cualitativas, en nuestro estudio, se ha llevado a cabo de la siguiente forma:

- Para comparar las variables cualitativas hemos utilizado el test de la Chi cuadrado, con la corrección de Yates en el caso de tablas 2x2, o el test exacto de Fisher en el caso de frecuencias pequeñas.
  
- Para comparar las variables cuantitativas hemos utilizado el test de Anova.
  
- El nivel de significación establecido fue el 0'05

### **3.2.7.- Mortalidad**

Semanalmente se contabilizaban los animales muertos, anotando el sexo y grupo a los que pertenecían, observando su aspecto externo para determinar una posible causa de la muerte. El animal muerto y retirado de su jaula se comenzó guardando en un congelador para su posterior estudio, pero a pesar de que la revisión de las jaulas en busca de animales muertos y su congelación era diaria, presentaban en su mayor parte un alto grado de autólisis al descongelarlas, por lo que no se les pudo hacer estudio postmortem.

## **4.- Resultados**

### **4.1- Resultados anatomopatológicos**

El número de muestras obtenidas así como el resultado anatomopatológico de las mismas (tumores y pólipos) y estadios de Dukes (entre paréntesis A, B, C o D) observados se recoge a continuación (cada animal se identifica con las siglas expresadas anteriormente):

#### **Grupo I:**

##### **Hembras:**

###### **1H1**

1 muestra:

- Tumoración de 0'7 cm. Adenocarcinoma invasivo poco diferenciado (A)

###### **2H1**

1 muestra:

- Tumoración de 0'3 cm. Adenocarcinoma invasivo hasta submucosa (A)

-Pólipo adenomatoso de 0'4 cm.

### **3H1**

2 muestras:

1 -Tumoración de 0'7 cm, Adenocarcinoma invasor con foco de transformación adenomatosa (B). Hasta serosa

-Pólipo adenomatoso de 4 cm

2 -leimosarcoma.

### **4H1**

1 muestra:

-Pólipo adenomatoso de 0'3 cm

### **5H1**

1 muestra:

-Normal

### **6H1**

1 muestra:

-Normal

### **7H1**

1 muestra:

-Tumoración de 0'4 cm, Adenocarcinoma invasivo bien diferenciado. Metástasis hepáticas (D)

-Pólipo adenomatoso de 0'7 cm, síndrome de cripta aberrante

### **8H1**

1 muestra:

-Hiperplasia folicular linfoide.

### **Machos:**

#### **9M1**

1 muestra:

-2 pólipos adenomatosos de 0'6 y 1 cm, Adenocarcinoma invasivo mucosecretor coloide (B)

#### **10M1**

1 muestra:

-Tumoración de 1 cm, Adenocarcinoma invasivo ( B)

-2 pólipos adenomatosos de 0'7 y 1 cm

#### **11M1**

2 muestras: (Tumoración de 1 cm)



- 1 -Adenocarcinoma polipoide no invasivo bien diferenciado tubular (A)
- 2 -Adenocarcinoma invasivo tubular bien diferenciado. (C) Metástasis ganglionares.

### **12M1**

1 muestra:

- Tumoración de 0'8 cm. Adenocarcinoma invasivo tubular. Metástasis hepáticas

(D)

### **13M1**

5 muestras:

- 1 -Tumoración de 0'8 cm. Adenocarcinoma invasivo poco diferenciado (B)
- 2 -1 pólipo adenomatoso de 0'7 cm
- 3 -4 pólipos adenomatosos de 0'6 cm
- 4 -Tumoración de 0'3 cm. Adenocarcinoma invasivo bien diferenciado hasta serosa

(B)

- 5 -Infiltrado inflamatorio con linfocitos

### **14M1**

1 muestra:

- Pólipo adenomatoso de 0'8 cm.

## **Grupo 2:**

### **Hembras:**

#### **15H2**

1 muestra:

-Tumoración de 0'8 cm, Adenocarcinoma invasivo bien diferenciado (C).

Metástasis ganglionar.

#### **16H2**

1 muestra:

-Pólipo mayor, tumoración de 0'5 cm

#### **17H2**

1 muestra:

-Tumoración de 0'4 cm. Adenocarcinoma polipoide no invasivo (A)

#### **18H2**

2 muestras:

1 -Quistes de inclusión epidérmica en cuello

2 -Adenocarcinoma invasivo infiltrante. Metástasis hepáticas (D)

## **19H2**

1 muestra:

-Transformación microscópica adenomatosa

## **20H2**

2 muestras:

1 -Infiltrado inflamatorio linfoide extenso (no hay cáncer)

2 -Nada

## **21H2**

2 muestras:

1 -Tumoración de 0'6 cm. Adenocarcinoma invasivo hasta serosa (B)

2 -Pólipo de 0'7 cm. Adenocarcinoma polipoide no invasivo (A)

## **22H2**

1 muestra:

-Nada

## **Machos:**

### **23M2**

1 muestra:

-Tumoración de 0'6 cm. Adenocarcinoma músculo invasivo hasta serosa (B)

### **24M2**

2 muestras:

1 -Tumoración de 0'7 cm. Adenocarcinoma intramucoso (A)

2 -Nada

### **25M2**

1 muestra:

-Tumoración de 0'3 cm. Adenocarcinoma músculo invasivo. Metástasis  
hepática(D)

### **26M2**

1 muestra:

-Tumoración de 0'3 cm. Adenocarcinoma músculo invasivo hasta serosa (C).  
Afectación ganglionar.

### **27M2**

1 muestra:

-Tumoración de 4 cm. Adenocarcinoma músculo invasivo (C). Metástasis  
ganglionares.

## **28M2**

2 muestras:

- 1 -Tumoración de 0'7 cm. Adenocarcinoma músculo invasivo (C)
- 2 -Tumoración de 0'7 cm. Adenocarcinoma polipoide no músculo invasivo (A)

## **29M2**

2 muestras:

- 1 -Tumoración de 0'7 cm. Adenocarcinoma polipoide músculo invasivo hasta grasa pericólica (B)
- 2 -Tumoración de 0'6 cm. Adenocarcinoma músculo invasivo (B)

## **30M2**

3 muestras:

- 1 -Tumoración de 0'7 cm. Adenocarcinoma polipoide no músculo invasivo (A)
- 2 -Igual (A)
- 3 -Igual (A)

## **Grupo 3**

### **Machos**

#### **31M3**

2 muestras:

- 1 -Tumoración de 0'5 cm. Adenocarcinoma coloide invasivo, metaplasia ósea (C)
- 2 -Nada, estasis vascular

#### **32M3**

1 muestra:

- Tumoración de 0'2 cm. Adenocarcinoma polipoide invasivo. Metástasis hepáticas (D)

#### **33M3**

1 muestra:

- Pólipo adenomatoso, 0'6 cm, atipias de alto grado

#### **34M3**

1 muestra:

- Tumoración de 0'7cm. Adenocarcinoma invasivo con áreas coloides y en anillo de sello. Metástasis hepáticas (D)

### **35M3**

1 muestra:

-3 tumores de 0'6 cm cada uno. Adenocarcinoma polipoide invasivo. Metástasis hepática (D)

### **36M3**

1 muestra:

-2 tumoraciones de 0'8 cm. Adenocarcinoma invasivo. Metástasis hepática (D)

## **Hembras**

### **37H3**

1 muestra:

-Tumoración de 0'5 cm. Adenocarcinoma invasivo. Metástasis hepática (D)

### **38H3**

1 muestra:

-Pólipo adenomatoso, 0'9 cm

### **39H3**

2 muestras:

1 -Tumoración de 0'4 cm. Adenocarcinoma tubular invasivo. Metástasis hepática  
(D)

2 -Tumoración de 0'4 cm. Adenocarcinoma polipoide no invasivo (C). Metástasis ganglionares.

### **40H3**

1 muestra:

-Pólipo adenomatoso de 0'9 cm.

### **41H3**

1 muestra:

-Tumoración de 0'4 cm, Adenocarcinoma polipoide invasivo bien diferenciado  
(C). Metástasis ganglionares.

-Pólipo adenomatoso de 0'8 cm.

### **42H3**

1 muestra:

-2 tumoraciones de 0'7 cm, carcinoma invasivo. Metástasis hepáticas (D)

### **43H3**

1 muestra:

-2 tumoraciones de 0'6 y 0'8 cm, Adenocarcinoma polipoide invasivo bien  
diferenciado (C). Metástasis ganglionares.



### **44H3**

1 muestra:

-Hiperplasia linfoide sin lesión neoplásica.

### **45H3**

1 muestra:

-2 tumoraciones de 0'6 cm. Adenocarcinoma polipoide (C). Metástasis ganglionares.

### **46H3**

1 muestra:

-Tumoración de 1'5 cm, carcinoma invasivo papilar. Metástasis hepáticas (D)

## **Grupo 4**

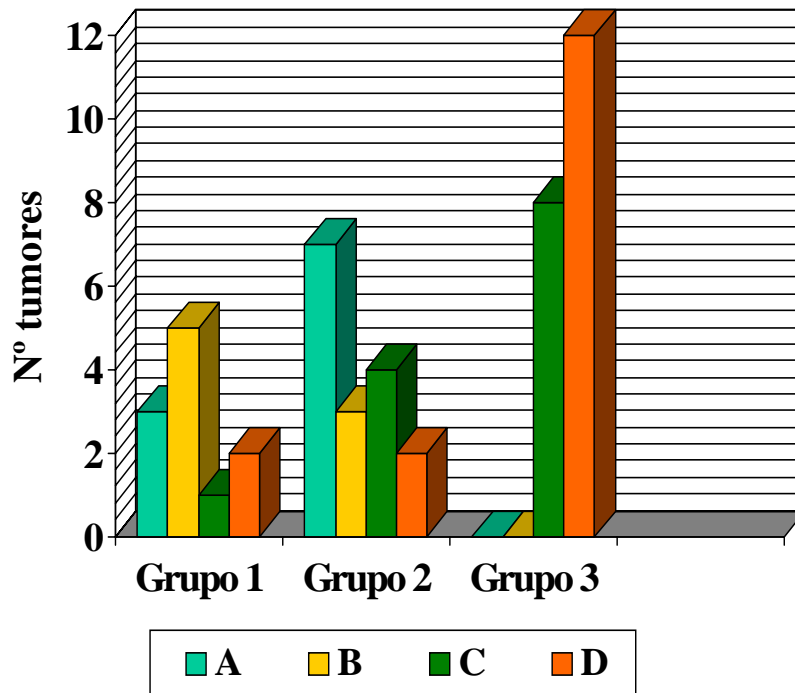
9 muestras, numeradas de la **47** a la **55**, todas ellas normales.

### **-Valoración global de los distintos grados de Dukes obtenidos**

En la siguiente tabla y gráfica se muestra el número y porcentaje de los distintos grados de Dukes en los tumores de los grupos 1, 2, 3 y sexo:

		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>G R U P O  1</b>	Machos	1 <b>14,3%</b>	4 <b>57,1%</b>	1 <b>14,3%</b>	1 <b>14,3%</b>
	Hembras	2 <b>50%</b>	1 <b>25%</b>	0 <b>0%</b>	1 <b>25%</b>
	Total grupo 1	3 <b>27,3%</b>	5 <b>45,4%</b>	1 <b>9,1%</b>	2 <b>18,2%</b>
<b>G R U P O  2</b>	Machos	5 <b>45,4%</b>	2 <b>18,2%</b>	3 <b>27,3%</b>	1 <b>9,1%</b>
	Hembras	2 <b>40%</b>	1 <b>20%</b>	1 <b>20%</b>	1 <b>20%</b>
	Total grupo 2	7 <b>43,7%</b>	3 <b>18,7%</b>	4 <b>25%</b>	2 <b>12,5%</b>
<b>G R U P O  3</b>	Machos	0 <b>0%</b>	0 <b>0%</b>	1 <b>12,5%</b>	7 <b>87,5%</b>
	Hembras	0 <b>25%</b>	0 <b>0%</b>	8 <b>61,5%%</b>	5 <b>38,5%</b>
	Total grupo 3	0 <b>0%</b>	0 <b>0%</b>	9 <b>42,8%</b>	12 <b>57,1%</b>

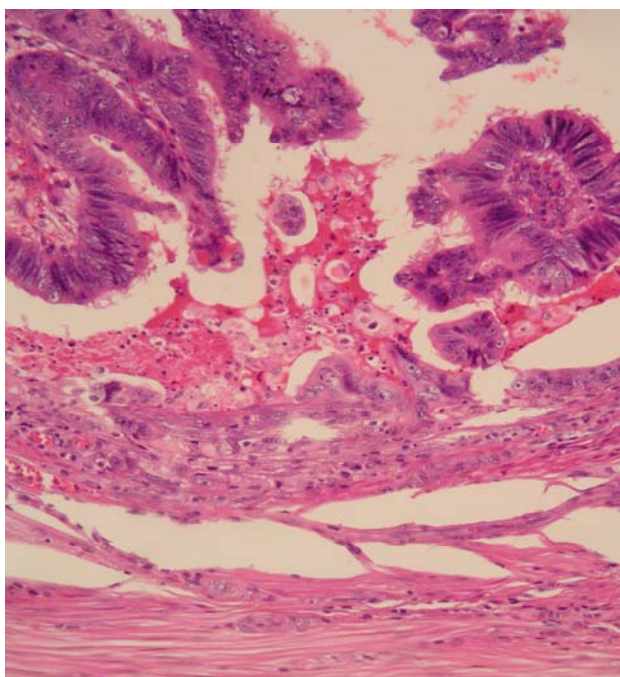
**Tabla 11- Número y porcentaje de grados de Dukes por grupos**



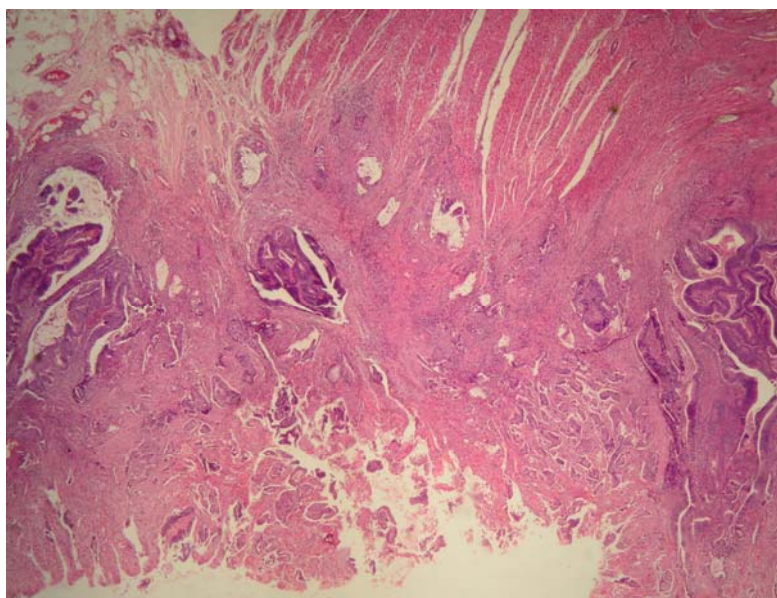
Nº de tumores/Estadios de Dukes en los 3 grupos

**-Fotos Microscopia:**

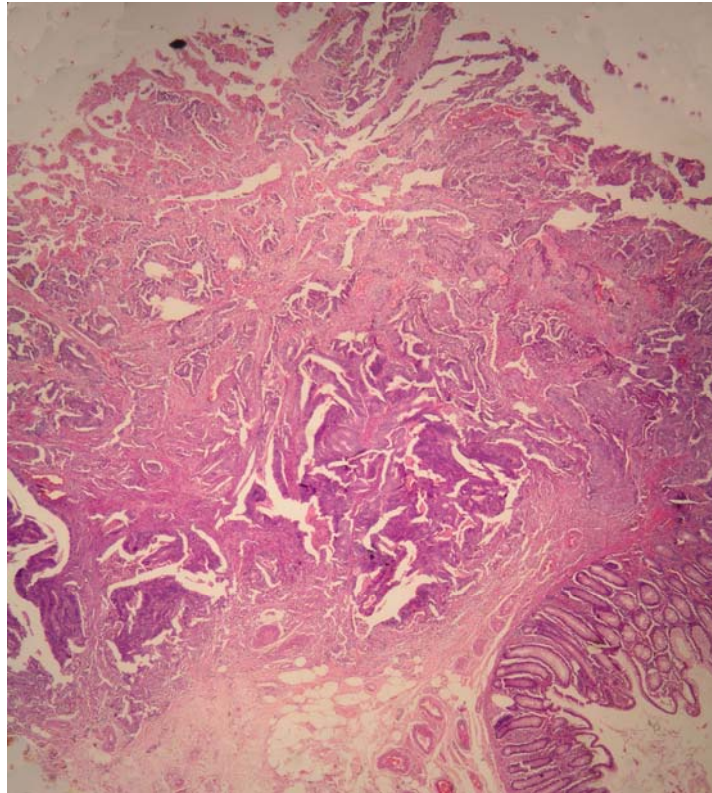
A continuación se exponen algunas de las imágenes más representativas observadas:



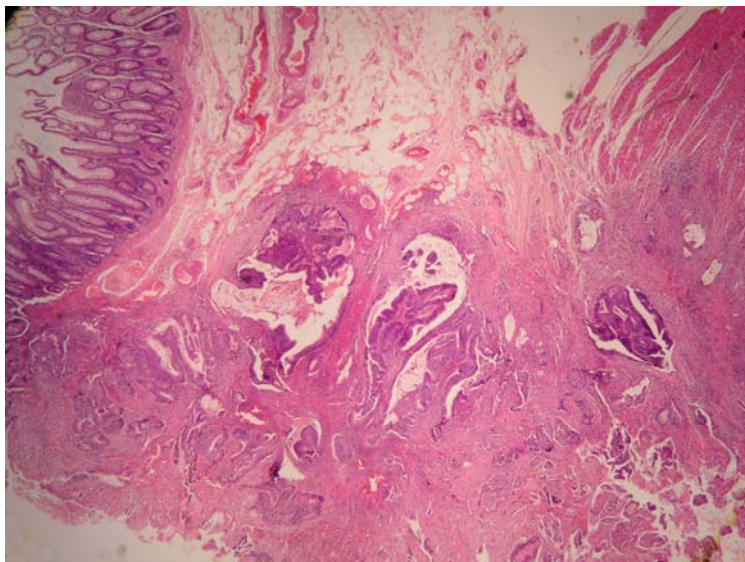
**Foto 1** – Adenocarcinoma polipoide Gr A de Dukes. Nótese la formación de papilas con infiltración superficial de la muscular propia (HE, 400x)



**Foto 2** – Adenocarcinoma invasivo Gr B de Dukes (HE, 100x)

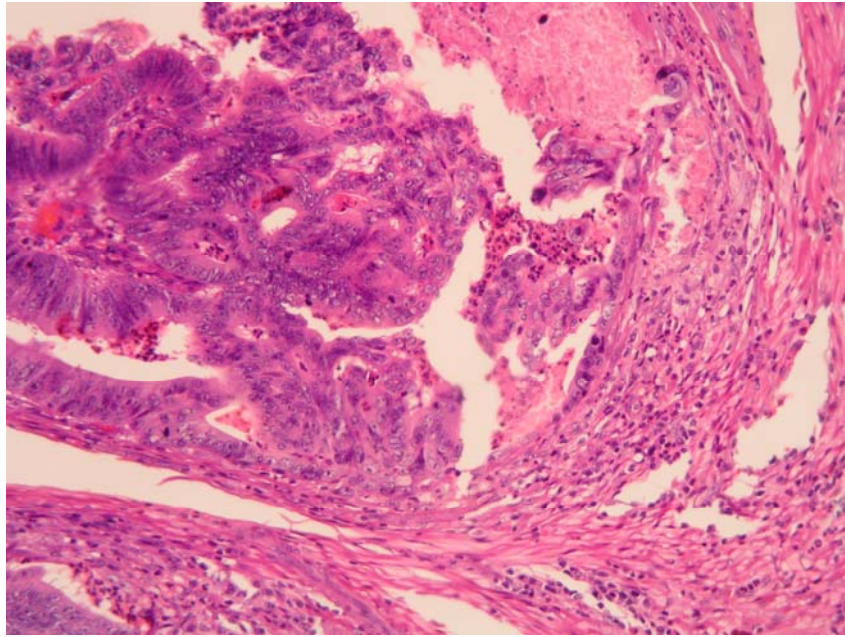


**Foto 3 - Adenocarcinoma bien diferenciado Gr C de Dukes (HE, 100x)**

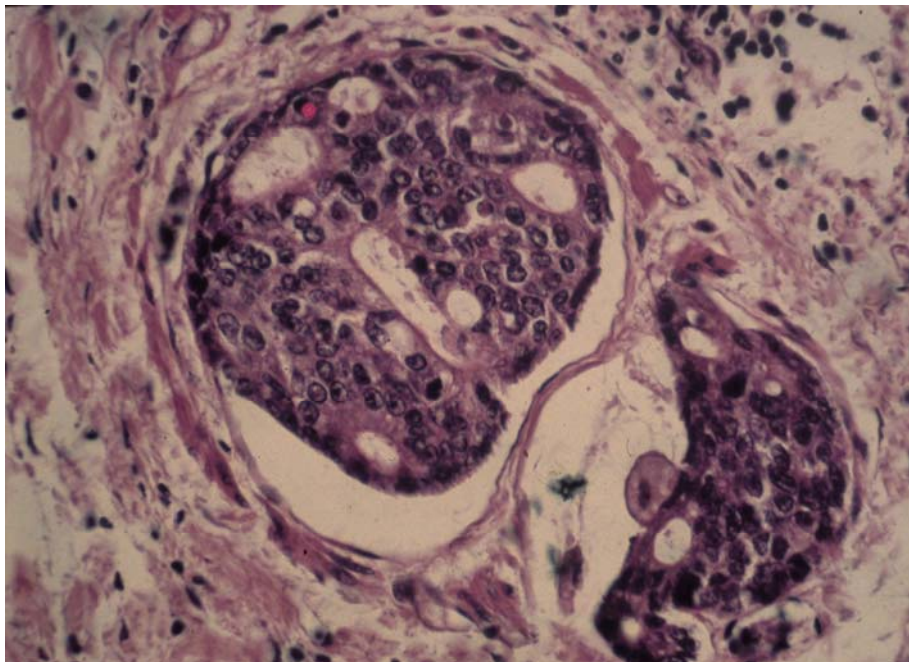


**Foto 4 - Adenocarcinoma invasivo Gr B de Dukes (HE, 100x)**

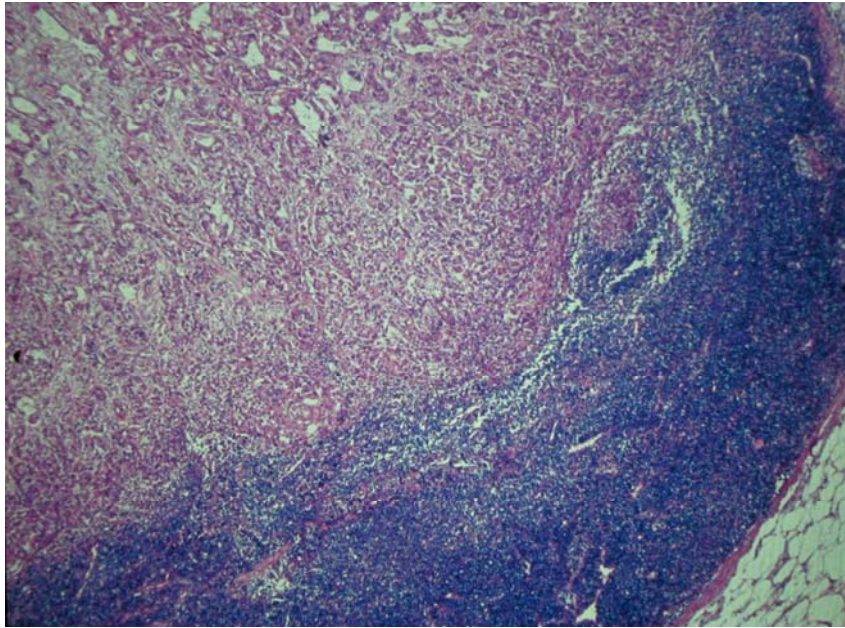




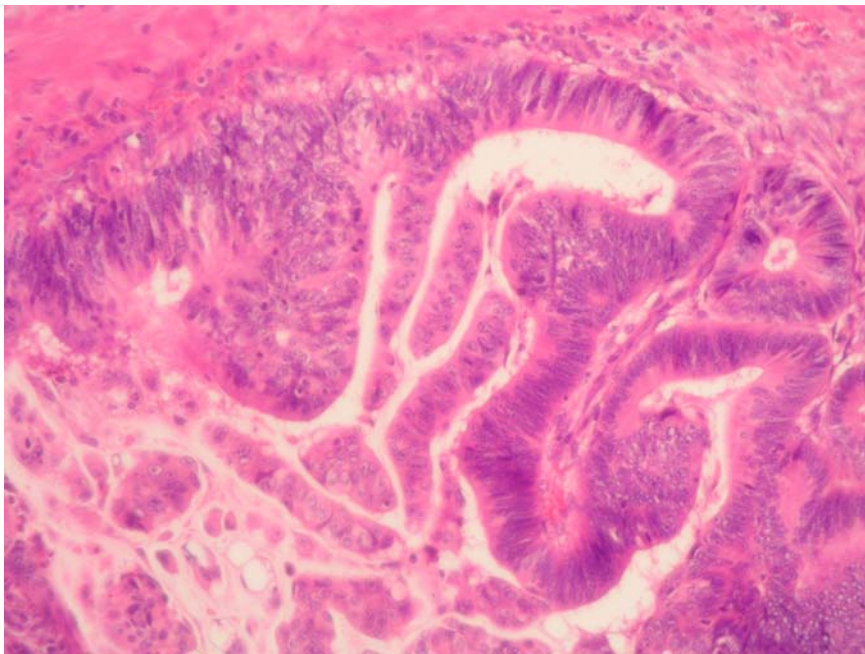
**Foto 5** - Adenocarcinoma bien diferenciado con bordes expansivos Gr A de Dukes (HE, 400x)



**Foto 6** - Invasión linfática (HE, 400x)

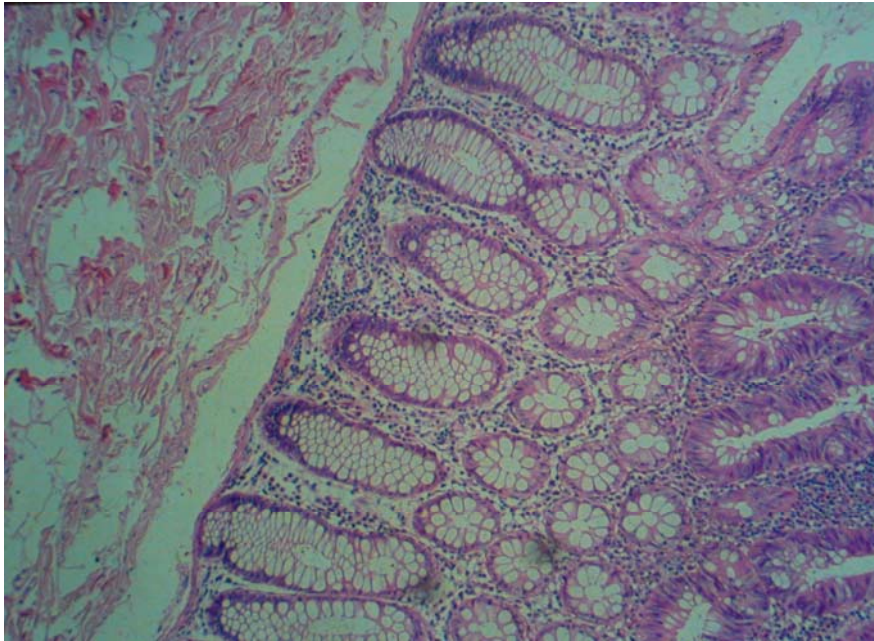


**Foto 7 - Metástasis tumoral (HE, 140x)**

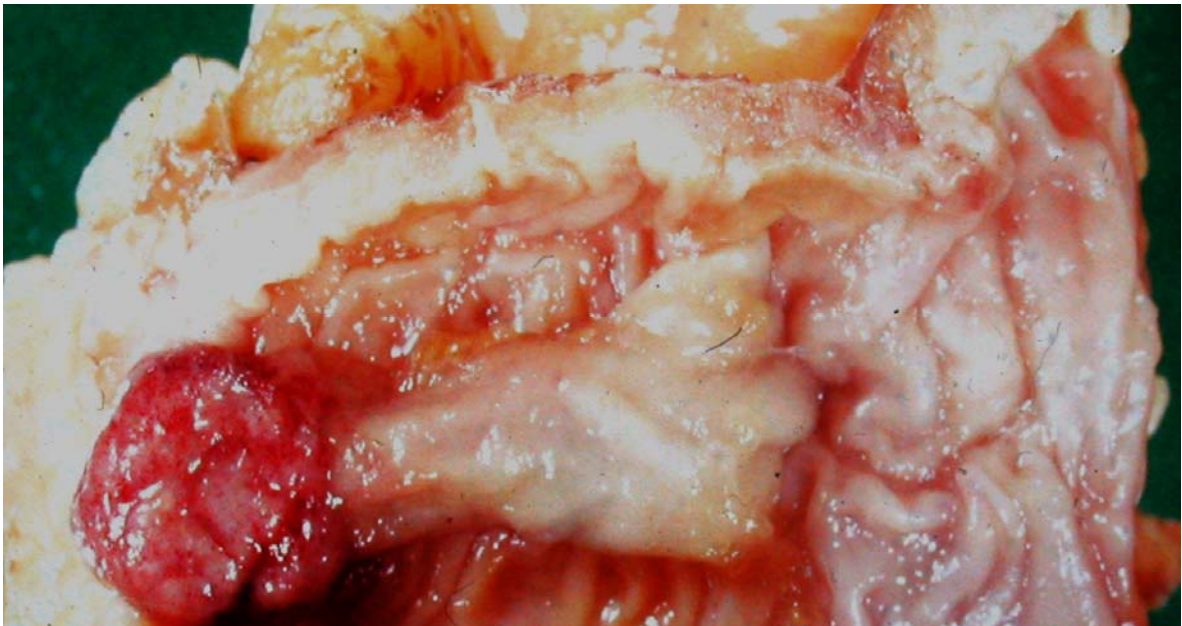


**Foto 8 - Patrón carcinoma intestinal, ha sido el mas frecuente de los que hemos visto, (HE, 400x)**





**Foto 9 - Pólipo adenomatoso (HE, 140x)**

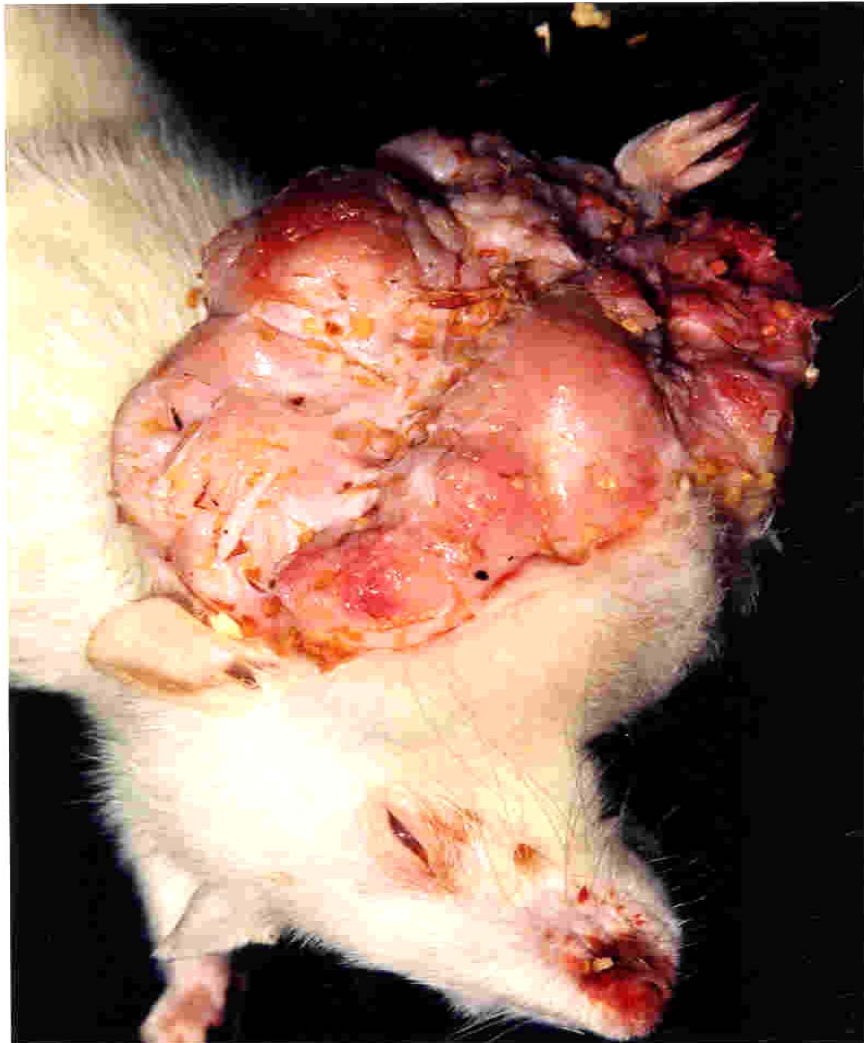


**Foto 10 - Imagen macroscópica de pólipo adenomatoso pediculado**



#### **4.1.1.- Macroscópicos**

En 2 de las ratas (ambas del grupo 2) se constató una masa quística prominente situada en la zona laterocervical del animal. (Foto 11)



**Foto 11 - Masa quística laterocervical**

El estudio microscópico de esta lesión correspondía a un quiste de inclusión epidérmica, esta lesión corresponde a un proceso benigno, caracterizado por una cavidad quística

tapizada por un epitelio escamoso queratinizante similar al observado en una epidermis normal.

#### **4.1.1.1.- De las piezas de colectomía**

El número de pólipos y carcinomas observados en este estudio están recogidos en las siguientes tablas (12,13 y 14) y gráficas (Tumores y Pólipos).

Igualmente las dimensiones medias en cada grupo así como la presencia de nódulos tumorales fuera del colon aparecen recogidas en las citadas tablas.

Todos los carcinomas observados en el grupo 3 correspondían a los grados C y D de Dukes, es decir a la forma más avanzada de esta graduación (Tabla 11). Además los 4 pólipos observados todos tenían atipias de alto grado y el mayor diámetro.

Todos estos datos histopatológicos parecen apoyar la idea de que el Celecoxib pudiera retardar el proceso neoplásico a las dosis actuales y en este tipo de animal.

	<b>NÚMERO TUMORES</b>	SUMA TOTAL(cm)	TAMAÑO MEDIO	RANGO DE LA MEDIA	NÓDULOS TUMORALES FUERA DEL COLON	<b>NÚMERO PÓLIPOS</b>	SUMA TOTAL	TAMAÑO MEDIO	RANGO DE LA MEDIA
MACHOS	5	3'9	0'78	0'3-0'1	3	10	7'2	0'72	0'6-1
HEMBRAS	4	2'1	0'52	0'3-0'7	1	4	5'4	1'35	0'3-0'7
<b>GRUPO 1</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>0'66</b>	<b>0'3-1</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>12'6</b>	<b>0'9</b>	<b>0'3-1</b>

**Tabla 12 - Grupo 1. Carcinomas y pólipos encontrados**

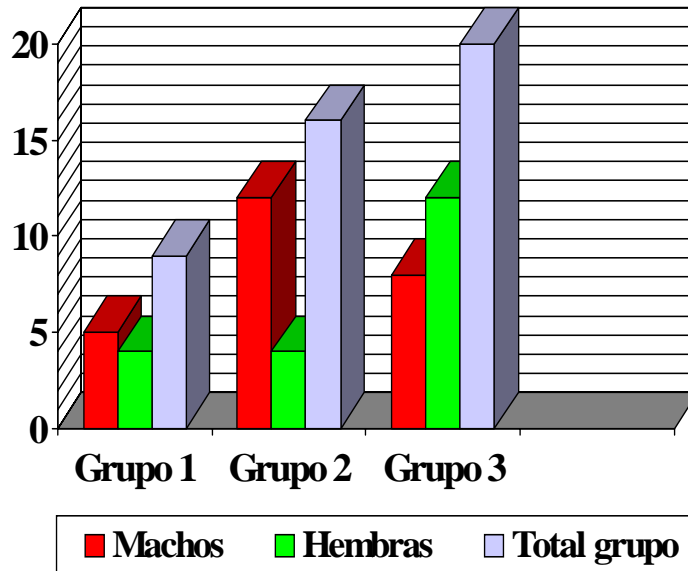
	<b>NÚMERO TUMORES</b>	SUMA TOTAL(cm)	TAMAÑO MEDIO	RANGO DE LA MEDIA	NÓDULOS TUMORALES FUERA DEL COLON	<b>NÚMERO PÓLIPOS</b>	SUMA TOTAL	TAMAÑO MEDIO	RANGO DE LA MEDIA
MACHOS	12	10'7	0'89	0'3-4	6	0	0	0	0
HEMBRAS	4	2'3	0'57	0'4-0'8	4	1	0'7	0'7	0'7
<b>GRUPO 2</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>0'81</b>	<b>0'3-1</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>0'7</b>	<b>0'7</b>	<b>0'7</b>

**Tabla 13 – Grupo 2. Carcinomas y pólipos encontrados**

	<b>NÚMERO TUMORES</b>	SUMA TOTAL(cm)	TAMAÑO MEDIO	RANGO DE LA MEDIA	NÓDULOS TUMORALES FUERA DEL COLON	<b>NÚMERO PÓLIPOS</b>	SUMA TOTAL	TAMAÑO MEDIO	RANGO DE LA MEDIA
MACHOS	8	4'8	0'60	0'2-0'8	10	1	0'60	0'60	0'60
HEMBRAS	12	7'6	0'63	0'4-1'5	9	3	2'60	0'86	0'8-0'9
<b>GRUPO 3</b>	<b>20</b>	<b>12'4</b>	<b>0'62</b>	<b>0'2-1'5</b>	<b>19</b>	<b>4</b>	<b>3'20</b>	<b>0'80</b>	<b>0'6-0'9</b>

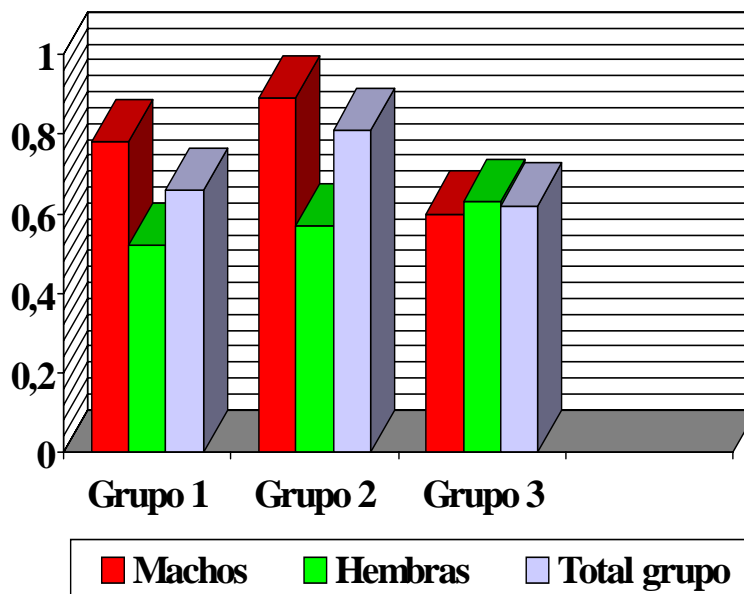
**Tabla 14 - Grupo 3. Carcinomas y pólipos encontrados**

## Tumores



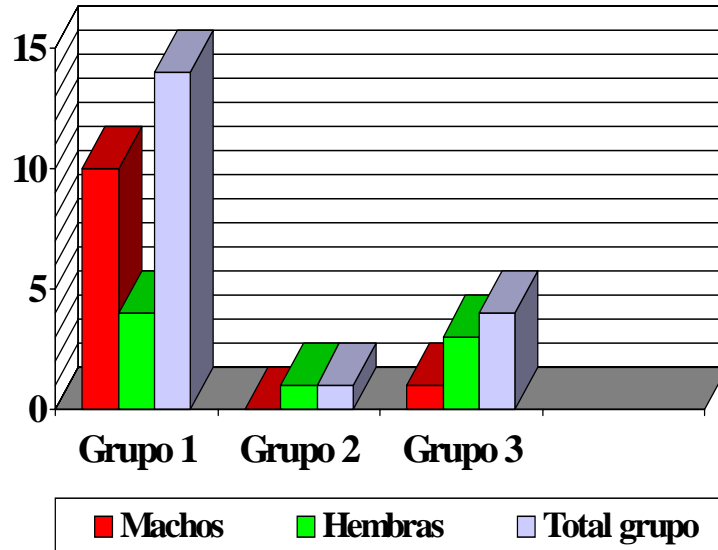
Número de tumores por grupo

## Tumores



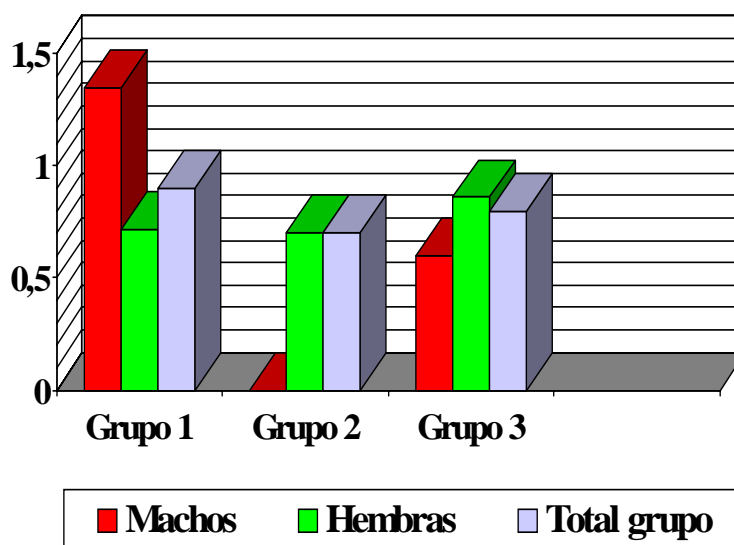
Tamaño medio de los tumores en los 3 grupos

## Pólipos



Número de pólipos por grupos

## Pólipos



Tamaño medio de los pólipos en los 3 grupos

#### **4.1.1.2.- Del estudio postmortem**

Se observaron nódulos blanquecinos de tamaño variable y distribución al azar en hígado de las ratas correspondientes a los 3 grupos, pero mientras que en el grupo 1 y 2 estos nódulos aparecieron en 4 ratas correspondientes a 4 tumores (7H1, 12M1, 18H2 y 25M2) con grado D de Dukes, en el grupo 3 se encontraron 8 tumores con grado C de Dukes y 12 tumores con grado D de Dukes (32M3, 34M3, 35M3, 36M3, 37H3, 39H3, 42H3, 46H3) y metástasis hepáticas.



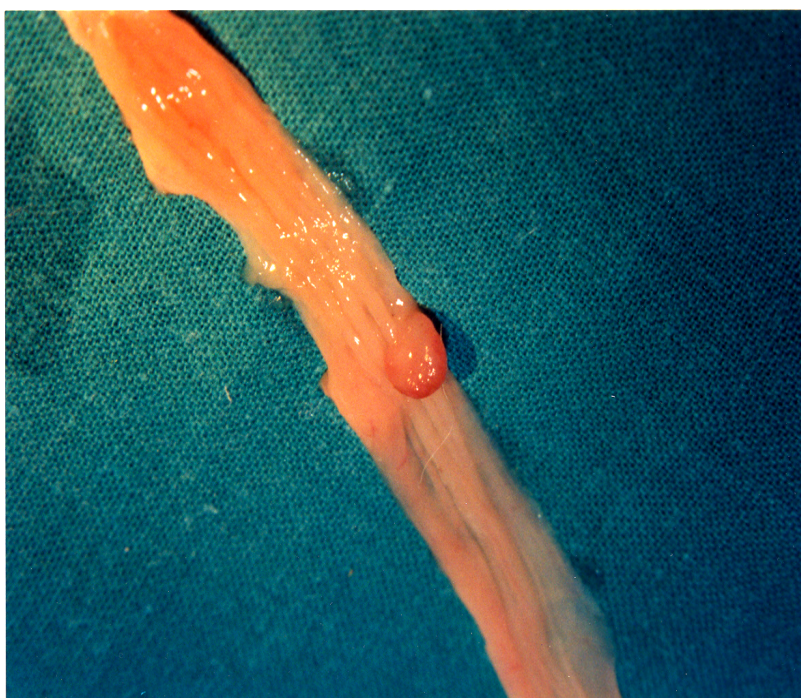
**Foto 12 - Leiomiosarcoma**

Las lesiones asociadas al proceso de carcinogenesis colónica están representadas en forma de quistes en región laterocervical (18H2) y en un caso en un leiomiosarcoma en retroperitoneo (3H1). (Foto 12)

#### **4.1.1.3.- Estudio macroscópico de los pólipos**

Todos los pólipos observados en los 3 grupos correspondían a pólipos pediculados cuyos tamaños y diámetros máximos medios se recogen en las tablas 12, 13 y 14.

En los Adenocarcinomas, el aspecto macroscópico correspondía a una lesión elevada y sesil (Foto 13), única o múltiple y que aparece predominantemente en el grupo 1 (70%).



**Foto 13 - Carcinoma sesil**

Otras veces el aspecto macroscópico fue úlcero-vegetante más frecuente en los grupos 2 y 3 (25% y 70% respectivamente) y por último la lesión era de aspecto fungoso y que siempre se observó en el grupo 3, estadios C y D de Dukes. (Tabla 15)

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Sesiles	70%	10%	0%
Ulcerovegetante	20%	70%	25%
fungosos	10%	20%	75%

**Tabla 15 - Aspecto macroscópico de los pólipos carcinomatosos**

#### **4.1.2.- Microscópicos**

##### **4.1.2.1.- Lesiones tumorales invasivas**

Se trata de una lesión neoplásica maligna de naturaleza epitelial que mide como media 0,69 cm. (rango entre 0,2 y 4 cm). El patrón de crecimiento ha sido, principalmente, de forma tubular. Sin embargo, junto a este patrón tubular se han identificado áreas coloides en un 30 % de los casos o áreas indiferenciadas en un 10 % de los casos. La presencia de lesión polipoide previa ha sido reconocida en un número importante de casos (75%). Las neoformaciones invaden con bordes expansivos e infiltrativos hasta alcanzar los tejidos subyacentes. En un 21,3 % (10 casos), la infiltración no sobrepasa la muscular propia y en un 17 % (8 casos), la neoformación alcanza la grasa pericólica. La permeación de vasos linfáticos en zonas peritumorales fue encontrada más frecuentemente en los tumores con borde infiltrativo, un 61,6 % (29 casos), frente a aquellos que presentaban un borde de crecimiento expansivo, un 21,3 % (10 casos).



En los casos de afectación de grasa pericólica a veces se identificaban lesiones inflamatorias granulomatosas a cuerpo extraño (moco intraglandular). La respuesta linfocitaria por parte del huésped al tejido tumoral fue bastante más evidente en los casos donde existía crecimiento expansivo que en aquellos otros en donde predominaba el crecimiento infiltrativo.

#### **4.1.2.2.- Pólipos**

Los pólipos encontrados aparecieron de forma sesil o pediculadas. Los pólipos pediculados median entre 0,4 y 0,8 cm. (media = 0,7 cm.), los pólipos sesiles median entre 0,6 y 1 cm. (media = 0,8 cm.), los pólipos pediculados mostraron un patrón de crecimiento claramente tubular. La presencia de áreas con displasias de alto grado era bastante más frecuente que las observadas y correspondiente a las de bajo grado. En dos de ellos se identificaron áreas hemorrágicas del estroma del pólipo con moderada cantidad de pigmento hemosiderínico, posiblemente por torsión del pedículo, en ninguno de los pólipos pediculados se identificó invasión del eje conectivo vascular.

En los pólipos sesiles el tamaño medio fue como se ha indicado de 0,8 cm. y con un rango de 0,6 a 1 cm. El patrón de crecimiento fue mayoritariamente velloadenomatoso. Las áreas de displasia de alto grado igualmente eran bastante más frecuentes que las de bajo grado y no se identificaron áreas de microabscesos crípticos. Tampoco se identificó invasión del tejido conectivo vascular ni de la base de implantación.

La mucosa cólica adyacente a estas lesiones (invasivas o no invasivas) mostró moderados cambios hiperproliferativos y en menor frecuencia cambios quísticos a algunas estructuras glandulares.

## **4.2.- Resultados estadísticos**

Se han analizado estadísticamente los siguientes parámetros:

### **4.2.1.- Mortalidad**

Esta ha sido muy elevada durante el estudio, principalmente a partir de la mitad del mismo (grupos 1, 2 y 3). En el grupo 4 (5 machos y 5 hembras) ha sido sólo del 10% (1 macho en la semana 40 por una malformación en los incisivos que le impedía comer) el resto de animales del grupo sobrevivió hasta la semana 52.

De 88 animales que iniciaron el estudio han sobrevivido hasta el final 55 (62'5%) registrándose 33 muertes (37'5%). Analizando la mortalidad de los 4 grupos no hemos obtenido significación estadística  $p= 0'253$  (nivel de significación establecido menor de 0'05). Al excluir del análisis al grupo 4 y analizando sólo los datos de los grupos 1, 2 y 3, tampoco obtenemos una mortalidad significativa,  $p= 0'809$ .

Si cruzamos los datos de los grupos 1 y 2 (en el grupo 1 se inició la administración de Celecoxib en la semana 1, mientras que en el grupo 2 el Celecoxib se comenzó a administrar 7 semanas después de la primera dosis de Azoximetano) y considerándolo un solo grupo frente al grupo 3, que sólo recibió Azoximetano, tampoco obtenemos significación estadística  $p= 0'745$ .

Sin embargo si comparamos los datos del grupo 3, con una mortalidad durante el estudio del 38'5%, con los del grupo 4 de control sin ningún tratamiento y mortalidad del 10% obtenemos una  $p=0'021$ .

#### **4.2.2- Presencia y número de Pólipos y Tumores**

Hemos considerado tanto la presencia y número de tumores y pólipos como el tamaño de los mismos.

##### **- Tumores**

Al analizar estadísticamente la presencia o no de los mismos en los cuatro grupos, el mayor número de estos corresponde al grupo 3 con un total de 20, mientras que en el grupo 1 han aparecido 9 y en el grupo 2 hemos encontrado 16, siendo nula la presencia de tumores en el grupo 4,  $p=0'007$ . Sin embargo si tenemos cuenta sólo los datos de los grupos 1, 2 y 3 excluyendo del análisis al grupo 4 no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la presencia de tumoraciones  $p=0'278$ .

En cuanto al tamaño no ha habido diferencias significativas en los tres grupos donde se han detectado,  $p=0'822$ , (el tamaño medio en el grupo 1 fue de 0'66 cm, en el grupo 2 de 0'81 cm y en el grupo 3 de 0'62)

De la misma forma que hemos hecho con la mortalidad se han analizado los datos de los grupos 1 y 2 como un solo grupo frente al grupo 3 y tanto en el tamaño como en el número de los tumores no ha habido diferencias significativas,  $p= 0'662$  y  $p= 0'296$ , respectivamente.

Sin embargo si sólo analizamos los datos de los grupos 3 (20 tumores) y 4 (ningún tumor) obtenemos una significación  $p=0'005$ , igualmente sucede con la presencia de tumores en el grupo 2 (16) con respecto al grupo 4 ( $p= 0'002$ ) y con la presencia de tumores en el grupo 1 (9) con respecto al grupo 4 ( $p=0'0039$ ).

#### **- Pólipos**

El número de pólipos encontrados en los distintos grupos ha sido variable, en el grupo 4 al igual que ocurriera con los tumores no ha habido ninguno, en el grupo 1 hemos encontrado 14, en el grupo 2 solo 1 y 4 en el grupo 3,  $p= 0'0038$ ,  $p= 0'048$ , al analizar los datos de los grupos 1 y 2 frente al grupo 3, respectivamente.

En cuanto al tamaño de los pólipos no ha habido diferencias significativas considerando sólo los grupos 1, 2 y 3, donde se han presentado,  $p= 0'748$ .

Al igual que hemos hecho anteriormente si valoramos en conjunto los grupos 1 y 2 como un solo grupo frente al grupo 3 no obtenemos diferencias significativas  $p= 0'624$

para el número de pólipos, pero en cuanto al tamaño de los mismos si hay diferencias  $p= 0'037$ .

El mayor numero de pólipos ha aparecido en el grupo 1 (14) con un tamaño medio de 0'9 cm. mientras que en el grupo 3 ha habido un total de 4 pólipos con un tamaño medio de 0'8 cm.  $p= 0'042$  y  $p= 0'048$  si consideramos también al grupo 4 donde no ha habido ninguno.

Si cruzamos los datos del grupo 3 (4 pólipos) con el grupo 4 y del grupo 2 (1 pólipo) con este grupo de control no obtenemos significación en los resultados  $p= 0'112$  y  $0'444$  respectivamente.

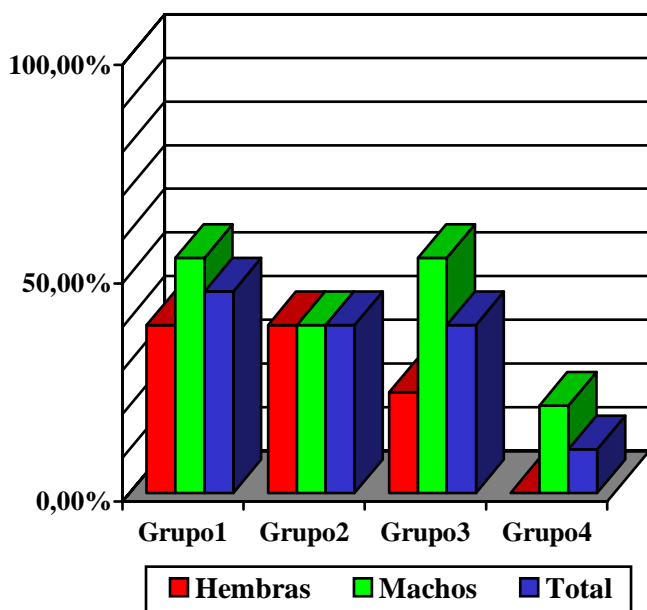
#### **4.2.3.- Grados de Dukes de los Tumores** (Tabla 11)

Como ya hemos comentado en el grupo 4 no ha habido ninguna tumoración. En los otros grupos ha sido en el grupo 3 donde han aparecido las tumoraciones de mayor gradación (42'8% grado C y 57'1% grado D) mientras que en los grupos 1 y 2 el mayor numero de tumores han correspondido a los grados A y B de Dukes,  $P= 0'012$ .

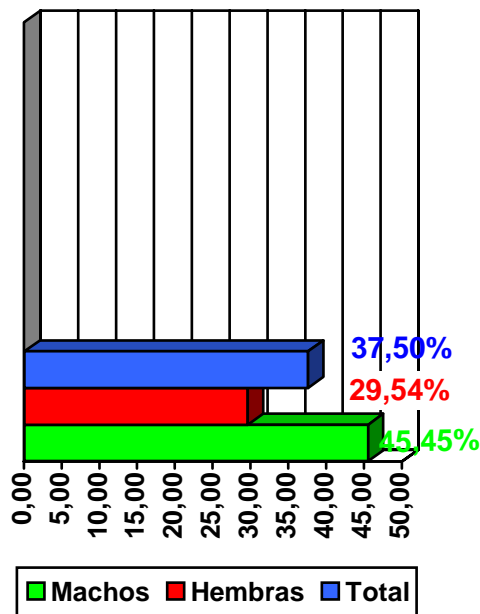
Al considerar los grupos 1 y 2 como 1 solo grupo tratado con Celecoxib frente al grupo 3 que solo recibió Azoximetano comprobamos que el mayor número de tumores con gradaciones A y B de Dukes se dan en el nuevo grupo creado, mientras que en el grupo 3 no ha habido ningún tumor con gradaciones A o B, siendo todos con grados C y D de Dukes,  $p= 0'005$ .

### 4.3.- Mortalidad

La mortalidad durante la primera mitad del estudio fue prácticamente nula y a partir de la semana 26 comenzó a acentuarse. (Tabla 16) El número de animales que sobrevivió al final del estudio (semana 52) fue de 55, registrándose durante el mismo un total de 33 animales muertos (se inicio con 88), lo que supone una mortalidad total del 37,5%, de ellos 13 fueron hembras, (representando el 29,5% del total) y 20 machos, (representando el 45,45% del total). (Ver graficas siguientes)



Mortalidad total



Mortalidad por sexo

		<b>Animales inicio</b>	<b>Fallecimientos Machos</b>	<b>Fallecimientos Hembras</b>	<b>Fallecimientos Totales</b>
<b>Grupo 1</b>	<b>N°</b>	<b>26</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>12</b>
	<b>% del grupo</b>	<b>100%</b>	<b>53'84%</b>	<b>38'46%</b>	<b>46'15%</b>
	<b>% del total</b>	<b>29'54%</b>	<b>15'91%</b>	<b>11'36%</b>	<b>13'64%</b>
<b>Grupo 2</b>	<b>N°</b>	<b>26</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
	<b>% del grupo</b>	<b>100%</b>	<b>38'46%</b>	<b>38'46%</b>	<b>38'46%</b>
	<b>% del total</b>	<b>29'54%</b>	<b>11'36%</b>	<b>11'36%</b>	<b>11'36%</b>
<b>Grupo 3</b>	<b>N°</b>	<b>26</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
	<b>% del grupo</b>	<b>100%</b>	<b>53'84%</b>	<b>23'07%</b>	<b>38'46%</b>
	<b>% del total</b>	<b>29'54%</b>	<b>15'91%</b>	<b>6'82%</b>	<b>11'36%</b>
<b>Grupo 4</b>	<b>N°</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
	<b>% del grupo</b>	<b>100%</b>	<b>20%</b>	<b>0%</b>	<b>10%</b>
	<b>% del total</b>	<b>11'36%</b>	<b>2'27%</b>	<b>0%</b>	<b>1'14%</b>
<b>Totales</b>	<b>N°</b>	<b>88</b>	<b>20</b>	<b>13</b>	<b>33</b>
	<b>%</b>	<b>100%</b>	<b>45'45%</b>	<b>29'54%</b>	<b>37'50%</b>

**Tabla 16 – Mortalidad durante el estudio**



La mortalidad por grupos y semanas fue la siguiente:

- **Grupo 1** - A las 52 semanas habían muerto 12 animales de 26 que comenzaron el estudio, lo que supuso una mortalidad de este grupo del 46,15%, de ellos 5 fueron hembras (mortalidad del 38,46%) y 7 machos (mortalidad del 53,84%). (Tabla 17)

SEMANAS	MUERTES TOTALES	MACHOS	HEMBRAS
26	1	–	1
28	1	1	–
42	1	1	–
43	1	1	–
44	3	1	2
45	3	3	–
49	1	–	1
51	1	–	1
<b>TOTALES</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>5</b>

**Tabla 17 – Número de muertes por semana grupo 1**

Con respecto a la totalidad del estudio este grupo representó una mortalidad total del 13,64%, el 15,91% los machos y el 11,36% las hembras. (Tabla 16)

- **Grupo 2** - Murieron un total de 10 animales de 26 lo que supuso una mortalidad en el grupo del 38,46%, de ellos 5 fueron hembras (mortalidad del 38,46%) y 5 fueron machos (mortalidad del 38,46%). (Tabla 18)

SEMANAS	MUERTES TOTALES	MACHOS	HEMBRAS
14	1	–	1
35	1	1	–
39	2	2	–
43	1	–	1
46	2	1	1
49	2	1	1
50	1	–	1
<b>TOTALES</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

**Tabla 18 – Número de muertes por semana grupo 2**

La mortalidad de este grupo representó el 11,36% del total del estudio, con el mismo número de machos que de hembras (11,36%). (Tabla 16)

- **Grupo 3** - Se registraron 10 muertes en total de 26 animales (38,46%),

De ellos 3 hembras (23,07%) y 7 machos (53,84%). (Tabla 19)

Con respecto al total de grupos la mortalidad representó el 11,36%, 15,91% los machos y 6,82% las hembras. (Tabla 16)

SEMANAS	MUERTE TOTALES	MACHOS	HEMBRAS
35	2	1	1
42	1	1	–
43	1	1	–
45	1	–	1
46	1	1	–
48	2	2	–
50	2	1	1
<b>TOTALES</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>3</b>

**Tabla 19 – Número de muertes por semana grupo 3**

- **Grupo 4** - Sobrevivieron 9 animales de los 10 que formaban el grupo. La muerte se produjo en la semana 40, por una malformación en los incisivos que le impedía comer, por lo que la mortalidad en este grupo podría considerarse nula.

## **5- Discusión**

En la génesis del cáncer colorrectal intervienen multitud de mecanismos y sistemas; podríamos decir que es un proceso multietapas y multifactorial. Son múltiples los factores que se relacionan con el mismo: dieta, hábitos de vida, factores ambientales o genéticos entre otros, etc.

Este proceso carcinogénico es primordial retrasarlo o invertirlo actuando sobre todos estos factores, bien mediante recursos químicos (quimioprevención) o desde otras fuentes dirigidas a las múltiples etapas y orígenes del proceso. Todo ello sin menospreciar el papel que juega la cirugía en las distintas fases del proceso ya instaurado.

La primera evidencia de la relación entre los AINES y el cáncer de colon procede de un estudio epidemiológico realizado por Kune, en 1988<sup>137</sup>, donde se observa una menor incidencia de CCR en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal que tomaban crónicamente sulfasalazina.

Ha quedado aceptado el modelo de carcinogénesis empleado con Azoximetano para estudio del CCR, como lo demuestran los múltiples estudios al respecto (Pozharisski KM<sup>120</sup>, Gilbert JM<sup>121</sup>, entre otros). En nuestro caso los 26 animales que formaban el grupo 3 y que sólo recibieron Azoximetano han sido los que más tumores han

desarrollado y todos correspondían al grado C y D de Dukes. En el grupo 4 (sin ningún tratamiento) no se ha desarrollado ningún tumor, mientras que los otros 3 grupos tratados con Azoximetano, aunque en distinto número, han desarrollado tumores con respecto a este grupo 4 ( $p=0'007$ ), siendo igualmente significativo el resultado analizando individualmente el número de tumores de cada grupo con respecto al grupo 4 de control ( $p=0'039$ ,  $0'002$  y  $0'005$  respectivamente para los grupos 1, 2 y 3). Así mismo, los 4 pólipos observados en el grupo 3 tenían todos atipias de alto grado y el mayor diámetro. Además al igual que describen Pozharisski KM<sup>120</sup>, Nagasawa HI<sup>122</sup>, Newberne PM<sup>128</sup>, Lamont JT<sup>130</sup> el desarrollo de los tumores se ha producido entre los 5 y 7 meses tras la administración de Azoximetano, coincidiendo con un aumento de mortalidad en dicho grupo 3 (semana 35). Paradójicamente en los grupos 1 y 2 la mortalidad se inicia en la semana 26 con mayor número de machos muertos que de hembras (principalmente en los grupos 1 y 3).

No hemos encontrado diferencias significativas, como lo apoyan los resultados estadísticos obtenidos, en cuanto a la utilidad del Celecoxib como quimioprolifático desde el punto de vista del número y tamaño de los tumores encontrados, aunque si se puede observar un enlentecimiento en el desarrollo y producción de los mismos, principalmente en el grupo 1 (donde se comenzó su administración desde el inicio) con respecto al grupo 2 (donde se inició el tratamiento con Celecoxib después de la primera administración de Azoximetano), el número de tumores fue menor en el grupo 1 que en el grupo 2 (9 y 16 respectivamente). Por otra parte el número de tumores en los grupos 1 y 2 ha sido menor que en el grupo 3 (20 carcinomas). En cuanto al tamaño de los

tumores se han detectado pocas diferencias, la media en el grupo 1 ha sido de 0,66 cm, en el grupo 2 de 0,81 cm y de 0'62 cm en el grupo 3. Quizás el mayor tamaño medio del grupo 2 pueda ser debido a una menor necrosis y muerte celular de los mismos, lo que ha permitido un mayor crecimiento tumoral.

Esta escasa diferencia en cuanto al tamaño observado en los carcinomas pudiera ser debida a:

1- Presencia de abundantes necrosis en los carcinomas correspondientes al grupo 3. La necrosis significa muerte celular y, por tanto, disminución de la masa tumoral proliferante.

2- La actividad antiproliferativa del Celecoxib antes de la actuación del carcinógeno podría ser insuficiente para impedir la transformación maligna, pero garantiza un mayor enlentecimiento del proceso neoplásico, puesto que en el grupo 2 donde el Celecoxib se empezó a utilizar en la 7ª semana tan sólo se obtuvo un pólipo y 16 carcinomas. En cambio en el grupo 1 donde el Celecoxib se aplicó en la 1ª semana y antes que la actuación del carcinógeno se obtuvieron 14 pólipos y 9 carcinomas y en el grupo 3 en donde no se aplicó el Celecoxib se observaron 4 pólipos con rango medio de 0'6 a 0'9 cm y tamaño medio de 0'8 cm, además de 20 carcinomas.

El Celecoxib en este estudio podría no solamente estar relacionado con un enlentecimiento de la proliferación celular sino que parece ser que su actuación antes o

después del carcinógeno no tiene repercusiones a la hora de originar metástasis, ya que tanto en el grupo 1 como en el 2 se han formado éstas, aunque en menor cuantía que en el grupo 3.

Con respecto a los grados de Dukes de los tumores si han aparecido diferencias significativas entre los tres grupos. Si observamos en el grupo 3 todos los tumores han presentado estadios C y D (42'8% y 57'1% respectivamente), mientras que en los grupos 1 y 2 los porcentajes mayores han correspondido a los grados A y B.

No ha habido diferencia significativa entre estos dos grupos 1 y 2, por lo que desde el punto de vista de la malignidad del tumor el administrar el Celecoxib antes o después del carcinógeno no modifica ésta, sin embargo, podemos afirmar que el celecoxib proporciona un efecto inhibitor sobre el desarrollo de las tumoraciones, ya que éstas tardan más en evolucionar a estadios más avanzados, independientemente de que se administre antes o después del Azoximetano.

A la vista de los resultados pensamos que el Celecoxib podría aportar efectos beneficiosos sobre el desarrollo del cáncer colorrectal, como así lo demuestran muchos estudios <sup>115, 116, 131, 133, 134, 136, 144, 164, 165, 167,</sup> . Aunque al igual que opinan Steinbach G.<sup>117</sup> y Reddy BS<sup>116, 133</sup>, creemos que principalmente ejercería su acción impidiendo la progresión tumoral a fases más avanzadas, una vez iniciada ésta, mientras que la actuación sobre el inicio del proceso tumoral no sería tan eficaz.

En nuestro caso los adenocarcinomas observados en el grupo 1 corresponden mayoritariamente a lesiones sesiles (70%) y las lesiones fungosas son mínimas (10%),

mientras que en el grupo 2 éstas aparecen en un 20%. Estos datos se podrían relacionar con una disminución en la agresividad y proliferación tumoral, al administrar el celecoxib antes de la actuación del carcinógeno (grupo 1) que una vez iniciada la misma (grupo 2).

De todas formas al igual que opinan Gupta RA<sup>144</sup> y Kawamori T<sup>115</sup>, entre otros, consideramos que los inhibidores de la COX-2 pueden ser útiles como agentes quimioprolifáticos ya que precisamente esta inhibición de la COX-2 sería la responsable del efecto antitumoral. La sobreexpresión de COX-2 es debida al epitelio displásico y neoplásico y ésta a su vez promueve la angiogénesis e inhibe la apoptosis induciendo el desarrollo tumoral. Probablemente esta expresión de COX-2 no suceda siempre en todos los cánceres colorrectales, al menos no en el 100%<sup>109, 110</sup> y al igual que opinan Shen H<sup>147</sup> y Reddy BS<sup>116</sup>, pensamos que el crecimiento de células cólicas tumorales que expresan COX-2 puede ser inhibido in vitro e in vivo con inhibidores de COX-2. Sin embargo, al ser el cáncer colorrectal una patología de etiología multifactorial puede ser muy variable la sobreexpresión de esta COX-2 en los tumores colorrectales ya que no todas las células la expresarían.

Por tanto, podríamos preguntarnos si existirían células neoplásicas carentes de COX-2 y, por ello, el quimiopreventivo detendría el crecimiento de las células que la expresan pero no en los que no lo hacen. Esta hipótesis es refrendada por el trabajo de Sheng H et al<sup>118</sup>. Es decir, los quimiopreventivos serían más citostáticos que citotóxicos.



Osima M. et al<sup>156, 157</sup> demuestran que en ratones con el gen mutante APC se expresa la COX-2 en los adenomas hallados y que al tratar a estos ratones con un inhibidor específico de COX-2 disminuye el número de pólipos. Igualmente en humanos con poliposis adenomatosa familiar (PAF) Gideon Steinbach<sup>117</sup>, Smalley WE<sup>163</sup>, y Jacoby RF<sup>165</sup>, demuestran que al ser tratados con AINES inducen la regresión de los pólipos existentes.

En nuestro estudio el número de pólipos hallados, cruzando los datos de los grupos tratados con Azoximetano, ha sido significativo. Ninguno en el grupo 4, 14 en el grupo 1, en el grupo 2 solo 1 y 4 en el grupo 3. No ha habido significación en cuanto al tamaño de los mismos, pero si enfrentamos los datos de los grupos 1 y 2 juntos, tratados con celecoxib, frente al grupo 3, sí aparece significación en cuanto al tamaño ( $p=0'037$ ). Estos datos apoyarían la idea de que el Celecoxib administrado previamente al carcinógeno podría inhibir el proceso neoplásico, principalmente al actuar sobre células que expresan COX-2.

Steinbach G et al<sup>117</sup> estudiaron a 77 pacientes con poliposis adenomatosa familiar con dos niveles de dosis de Celecoxib durante 6 meses y comprobaron que disminuyó el número de pólipos. A pesar de todo y dada la duración del presente estudio, 52 semanas, apoyamos la idea de Shen H<sup>118</sup> y Giardiello FM<sup>114</sup>, de que los efectos quimiopreventivos de la inhibición de la COX-2 pueden ser transitorios e incrementarse el número de pólipos una vez abandonado el tratamiento o prolongado este excesivamente, al menos en la población no afecta de PAF, enfermedad grave,

hereditaria y rara (aproximadamente la padecen 2000 personas en nuestro país con una incidencia menor a 5 por 10000 habitantes), que no es objetivo de nuestro trabajo y donde el Celecoxib está ya autorizado por las agencias reguladoras del medicamento, (pronunciamiento favorable en octubre de 2005 por la Agencia Europea del Medicamento, EMEA), ya que de seguir su propia evolución acaba degenerando en cáncer de colon en la mayoría de los casos y donde hasta ahora su abordaje se limitaba a la cirugía y vigilancia endoscópica de los pólipos intestinales. El tratamiento con Celecoxib reduce pues el tamaño y número de los mismos<sup>117</sup>.

El desarrollo de agentes anticancerosos debería ir encaminado a la creación de moléculas antiseñales celulares, estableciendo una similitud entre agentes quimiopreventivos y quimioterápicos, considerando al cáncer colorrectal como un proceso multifactorial y multietapas, donde intervienen muchos sistemas en su formación, por tanto un agente quimioterápico eficaz debería poseer propiedades anticarcinógenas distintas.

Por último, creemos que con un mejor conocimiento molecular y epidemiológico de la carcinogénesis colorrectal y del riesgo de desarrollar cáncer, la quimiopreención eficaz de esta “común” enfermedad es una proposición realista.

## **6- Conclusiones**

- 1- El número de animales machos muertos durante el estudio ha sido igual o superior al de hembras en los 3 grupos que recibieron Azoxymetano. Todas las muertes se iniciaron a partir de la mitad del estudio (semana 26).
- 2- Desde el punto de vista de la mortalidad, no ha habido diferencias significativas entre los grupos 1 y 2 (que recibieron Celecoxib) y el grupo 3 que sólo recibió Azoxymetano.
- 3- Todos los animales del grupo 3 han desarrollado algún tumor, por lo que queda demostrada la utilidad del Azoxymetano como carcinógeno.
- 4- A pesar de la similitud de las cifras de mortalidad durante el estudio en los grupos 1, 2 y 3, desde el punto de vista anatomopatológico y tras analizar los resultados de las piezas de colectomía, se han evidenciado diferencias que apoyan la idea del Celecoxib como quimioproliférico.
- 5- La administración de Celecoxib antes o después del Azoxymetano no ha reportado diferencias en cuanto a la aparición de metástasis.

- 6- El número de metástasis ha sido menor en los animales tratados con Celecoxib (grupos 1 y 2), que en los animales tratados sólo con Azoxymetano (grupo 3).
- 7- La agresividad y proliferación tumoral ha sido menor en los animales del grupo 1 (recibieron Celecoxib antes de la administración de Azoxymetano) que en los animales del grupo 2 (recibieron Celecoxib después de iniciar la administración de Azoxymetano).
- 8- La administración de Celecoxib antes de iniciar el tratamiento con Azoxymetano (grupo 1), inhibe el proceso tumoral en mayor medida que si se administra el Celecoxib después de la administración de Azoxymetano (grupo 2). En general el tratamiento con Celecoxib (grupos 1 y 2) ha inhibido más el proceso tumoral (menor número de tumores) que en los animales no tratados (grupo 3).
- 9- El tratamiento con Celecoxib una vez iniciado el proceso tumoral (tratamiento con Azoxymetano) puede impedir la progresión a estadios más avanzados.
- 10- Tras analizar los datos de estadificación de Dukes en los distintos grupos (Tabla 11), podemos afirmar que el Celecoxib ha enlentecido la proliferación tumoral, independientemente de si se administra antes o después de la inducción tumoral con Azoximetano.

11- Tras analizar el número de pólipos en los grupos 1, 2 y 3, podemos concluir que el Celecoxib administrado previo a la inducción tumoral por Azoxyetano enlentece el proceso neoplásico.

## **7-. Bibliografía**

1-Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al. "SEER Cancer Statistics Review 1973-1997". Bethesda, MD, USA, National Cancer Institute, 2000.

2-Arnaud JP, Buyse M, Nordlinger B. "Adjuvant therapy of poor prognosis colon cancer with levamisole: results of an EORTC doubleblind randomized clinical trial". Br J Surg 1989; 76: 284-289.

3-Midgley R, Kerr D. "Colorectal cancer". Lancet 1999; 353: 391-399.

4-Potter JD. "Colorectal cancer: molecules and populations". J Natl CancerInst 1999; 91: 916-932.

5-Muir C, Waterhouse J, Mack T, Powell J, Whelan S, Smans M, eds. "Cancer Incidence in Five Continents". Lyon, France, Internacional Agency for Research on Cancer, 1987.

6-Cummings JH, Bingham SA. "Diet and the prevention of cancer". Br Med J 1998; 317: 1636-1640.

7-Thorson AG, Knezetic JA, Lynch HT. "A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome)". Dis Colon Rectum 1999; 42(1): 1-9.

8-Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA, et al. "Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members". Cancer 1998; 83(2): 259-266.

9-Ransohoff DF, Lang CA. "Screening for colorectal cancer". N Engl J Med 1991; 325(1): 37-41.

10-Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, et al. "A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer". N Engl J Med 1994; 331(25): 1669-1674.

11-Winawer SJ. "Screening for colorectal cancer". *Cancer: Principles and Practice of Oncology Updates* 1987; 2(1): 1-16.

12-Lippman SM, Benner SE, Hong WK. "Cancer chemoprevention". *J Clin Oncol.* 1994; 12: 851-873.

13-De Flora S, Balansky R, Scatolini L, et al. "Adducts to nuclearDNA and mitochondrial DNA as biomarkers in chemoprevention. In Stewart BW, McGregor D, Kleihues P". Eds. *Principles of Chemoprevention*. Lyon, France, IARC Scientific 1996; 139: 291-301.

14-Sporn MB, Newton DL. "Chemoprevention of cancer with retinoids". *Fed Proc* 1979. 38: 2528-2534

15-Saclarides TJ, Szeluga D, Staren ED. "Neuroendocrine cancers of the colon and rectum. Results of a ten-year experience". *Dis Colon Rectum* 1994. 37(7): 635-642.



16-Colon and rectum. In American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002; pp 113-124.

17-Dukes CE. "The classification of cancer of the rectum". J Pathol Bacterial 1932; 35: 323-333.

18-Astler VB, Collier FA. "The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum". Ann Surg 1954; 192: 846-885.

19-Compton CC, Greene FL. "The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. CA" Cancer J Clin 2004; 54(6): 295-308.

20-Nelson H, Petrelli N, Carlin A, et al. "Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery". J Natl Cancer Inst 2001; 93(8): 583-596.

21-Swanson RS, Compton CC, Stewart AK, et al. "The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined". Ann Surg Oncol 2003; 10(1): 65-71.

22-Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, et al. "Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089". J Clin Oncol 2003 ; 21(15): 2912-2919.

23-Prandi M, Lionetto R, Bini A, et al. "Prognostic evaluation of stage B colon cancer patients is improved by an adequate lymphadenectomy: results of a secondary analysis of a large scale adjuvant trial". Ann Surg 2002; 235(4): 458-463.

24-Tepper JE, O'Connell MJ, Niedzwiecki D, et al. "Impact of number of nodes retrieved on outcome in patients with rectal cancer". J Clin Oncol 2001 19(1): 157-163.

25-Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. "Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer". J Clin Oncol 1995; 13(12): 2936-2943.

26-Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, et al. "Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04)". J Clin Oncol 1999; 17(5): 1349-1355.

27-“Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators”. *J Clin Oncol* 1999 ; 17(5): 1356-1363.

28-Willett C, Tepper JE, Cohen A, et al. “Local failure following curative resection of colonic adenocarcinoma”. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10(5): 645-651.

29-Willett C, Tepper JE, Cohen A, et al. “Obstructive and perforative colonic carcinoma: patterns of failure”. *J Clin Oncol* 1985; 3(3): 379-384.

30-Gunderson LL, Sosin H, Levitt S. “Extrapelvic colon areas of failure in a reoperation series: implications for adjuvant therapy”. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985; 11(4): 731-741.

31-Willett CG, Fung CY, Kaufman DS, et al. “Postoperative radiation therapy for high-risk colon carcinoma”. *J Clin Oncol* 1993; 11(6): 1112-1117.

32-Willett CG, Goldberg S, Shellito PC, et al. "Does postoperative irradiation play a role in the adjuvant therapy of stage T4 colon cancer?" *Cancer J Sci Am* 1999; 5(4): 242-247.

33-Schild SE, Gunderson LL, Haddock MG, et al. "The treatment of locally advanced colon cancer". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37(1): 51-58.

34-Serafini AN, Klein JL, Wolff BG, et al. "Radioimmunoscinigraphy of recurrent, metastatic, or occult colorectal cancer with technetium 99m-labeled totally human monoclonal antibody 88BV59: results of pivotal, phase III multicenter studies". *J Clin Oncol* 1998; 16(5): 1777-1787.

35-Wagman LD, Kemeny MM, Leong L, et al. "A prospective, randomized evaluation of the treatment of colorectal cancer metastatic to the liver". *J Clin Oncol* 1990; 8(11): 1885-1893.

36-Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann. "A Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history". *Br J Surg* 1990; 77(11): 1241-1246.

37-Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A, et al. "Indicators of prognosis after hepatic resection for colorectal secondaries". *Surgery* 1991; 110(1): 13-29.

38-Adson MA, van Heerden JA, Adson MH, et al. "Resection of hepatic metastases from colorectal cancer". *Arch Surg* 1984; 119(6): 647-651.

39-Coppa GF, Eng K, Ranson JH, et al. "Hepatic resection for metastatic colon and rectal cancer. An evaluation of preoperative and postoperative factors". *Ann Surg* 1985; 202(2): 203-208.

40-Gayowski TJ, Iwatsuki S, Madariaga JR, et al. "Experience in hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of clinical and pathologic risk factors". *Surgery* 1994; 116(4): 703-710; discussion 710-711.

41-Fernández-Trigo V, Shamsa F, Sugarbaker PH. "Repeat liver resections from colorectal metastasis. Repeat Hepatic Metastases Registry". *Surgery* 1995; 117(3): 296-304.

42-Jaeck D, Bachellier P, Guiguet M, et al. "Long-term survival following resection of colorectal hepatic metastases". Association Française de Chirurgie. Br J Surg 1997; 84(7): 977-980.

43-Taylor M, Forster J, Langer B, et al. "A study of prognostic factors for hepatic resection for colorectal metastases". Am J Surg 1997; 173 (6): 467-71.

44-Elias D, Cavalcanti A, Sabourin JC, et al. "Resection of liver metastases from colorectal cancer: the real impact of the surgical margin". Eur J Surg Oncol 1998; 24(3): 174-179.

45-Girard P, Ducreux M, Baldeyrou P, et al. "Surgery for lung metastases from colorectal cancer: analysis of prognostic factors". J Clin Oncol 1996; 14(7): 2047-2053.

46-Defunciones según la Causa de Muerte 2002. Tablas Nacionales. Distribución de la mortalidad por causas. Tumores. Ambos sexos. Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.es/>

47-Atkin G, Chopada A, Mitchell I. "Colorectal cancer metastasis: in the surgeon's hands?". *Int Semin Surg Oncol* 2005; 2: 1-8.

48-Obrand DI, Gordon PH. "Incidence and patterns of recurrence following curative resection for colorectal carcinoma". *Dis Colon Rectum*. 1997; 40: 15-19.

49-Nelson H, Petrelli N, Carlin A, et al. "Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery". *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93: 583-596.

50-Saltz LB, Minsky B. "Adjuvant therapy of cancers of the colon and rectum". *Surg Clin North Am*. 2002; 82:1035-1058.

51-D, McGregor JR, Dahill SW, et al. "Collagen promotes perianastomotic tumor growth in an experimental animal model". *J Surg Oncol*. 1995; 60: 112-116.

52-Van Rossen MEE, Hofland LJ, Van den Tol MP, et al. "Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumor cell adhesions to the peritoneum". *J Pathol*. 2001; 193: 530-534.

53-Colorectal Cancer Collaborative Group. "Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8.507 patients from 22 randomised trials". *Lancet*. 2001; 358: 1291-1304.

54-Anthony T, Simmang C, Hyman N, et al. "Practice parameters for the surveillance and follow-up of patients with colon and rectal cancer". *Dis Colon Rectum*. 2004; 47: 807-817.

55-Saltz LB, Cox JV, Blanke C, et al. "Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer". *N Engl J Med* 2000; 343: 905-914.

56-Hughes KS, Simon R, Songhorabodi S, et al. "Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases: a multi-institutional study of patterns of recurrence". *Surgery* 1986; 100(2): 278-284.

57-Schlag P, Hohenberger P, Herfarth C. "Resection of liver metastases in colorectal cancer. Competitive analysis of treatment results in synchronous versus metachronous metastases". *Eur J Surg Oncol* 1990 ; 16(4): 360-365.



58-Rosen CB, Nagorney DM, Taswell HF, et al. "Perioperative blood transfusion and determinants of survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma". *Ann Surg* 1992; 216(4): 493-504; discussion 504-505.

59-Fong Y, Fortner J, Sun RL, et al. "Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases". *Ann Surg* 1999 ; 230(3): 309-318; discussion 318-321.

60-Rossi S, Buscarini E, Garbagnati F, et al. "Percutaneous treatment of small hepatic tumors by an expandable RF needle electrode". *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170(4): 1015-1022.

61-Solbiati L, Livraghi T, Goldberg SN, et al. "Percutaneous radio-frequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer: long-term results in 117 patients". *Radiology* 2001; 221(1): 159-166.

62-Lencioni R, Goletti O, Armillotta N, et al. "Radio-frequency thermal ablation of liver metastases with a cooled-tip electrode needle: results of a pilot clinical trial". *Eur Radiol* 1998; 8(7): 1205-1211.

63-Curley SA, Izzo F, Delrio P, et al. "Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients". *Ann Surg* 1999; 230(1): 1-8.

64-Hurwitz H, Fehrenbacher L, Cartwright T, et al. "Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) prolongs survival in first-line colorectal cancer (CRC): results of a phase III trial of bevacizumab in combination with bolus IFL (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) as first-line therapy in subjects with metastatic CRC". *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 2003; 22: A 3646.

65-Livraghi T, Solbiati L, Meloni F, et al. "Percutaneous radiofrequency ablation of liver metastases in potential candidates for resection: the test-of-time approach". *Cancer* 2003; 97(12): 3027-3035.

66-Jarnagin WR, Fong Y, Ky A, et al. "Liver resection for metastatic colorectal cancer: assessing the risk of occult irresectable disease". *J Am Coll Surg* 1999; 188(1): 33-42.

67-Ravikumar TS, Kaleya R, Kishinevsky A. "Surgical ablative therapy of liver tumors". *Cancer: Principles and Practice of Oncology Updates* 2000; 14(3): 1-12.

68-Seifert JK, Morris DL “Prognostic factors after cryotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer”. *Ann Surg* 1998; 228(2): 201-208.

69-Thomas DS, Nauta RJ, Rodgers JE, et al. “Intraoperative high-dose rate interstitial irradiation of hepatic metastases from colorectal carcinoma. Results of a phase I-II trial”. *Cancer* 1993; 71(6): 1977-1981.

70-Ravikumar TS “Interstitial therapies for liver tumors”. *Surg Oncol Clin N Am* 1996; 5(2): 365-377.

71-McAfee MK, Allen MS, Trastek VF, et al. “Colorectal lung metastases: results of surgical excision”. *Ann Thorac Surg* 1992; 53(5): 780-785; discussion 785-786.

72-Headrick JR, Miller DL, Nagorney DM, et al. “Surgical treatment of hepatic and pulmonary metastases from colon cancer”. *Ann Thorac Surg* 2001; 71(3): 975-979; discussion 979-980.

73-Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. "Cetuximab (C225) alone or in combination with irinotecan (CPT-11) in patients with epidermal growth factor receptor (EGFR)-positive, irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer". Proceedings of the American Society of Clinical Oncology 2003; 22: A-1012-1252.

74-Steinberg SM. Barkin JS. Kaplan RS. et al. "Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience". Cancer 1986; 57(9): 1866-1870.

75--McLeod HL, Murray GI. "Tumour markers of prognosis in colorectal cancer". Br J Cancer. 1999; 79(2): 191-203.

76-Ries LAG. Wingo RAW. Miller S. Howe HL. Weir HK. Rosenberg HM. Vernone SW. Cronin K. Edwards BK. "The annual report to the nation on the status of cancer, 1973 - 1997, with a special section on colorectal cancer". Cancer 2000; 88(10): 2398-2424.

77-Jacobs M. Verdeja JC. Goldstein HS. "Minimally invasive colon resection (laparoscopic colectomy)". Surg Laparosc Endosc 1991; 1: 144-150.

78-Franklin ME. Ramos R. Rosenthal D. Schuessler W. "Laparoscopic colonic procedures". World J Surg 1993; 17: 51-56.

79-Lacy AM. Garcia Valdecasas JC. Delgado S. Castells A. Taura P. Pique JM. Visa J. "Laparoscopic-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon-cancer: a randomised clinical trial". Lancet 2002; 359(9325): 2224-2229.

80-Clinical Outcomes of Surgical Therapy Group. "A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for cancer". N Eng J Med 2004; 350(20): 2050-2059.

81-Braga M. Frasson M. Vignali A. Zuliani W. Civelli V. Di Carlo V. "Laparoscopic versus open colectomy in cancer patients: long-term complications, quality of life, and survival". Dis Colon Rectum 2005; 48: 2217-2223.

82-Jayne DG. Guillou PJ. Thorpe H. Quirke P. Copeland J. Smith A. Heath RM. Brown J. "Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-year results of the UK MRC CLASICC Trial Group". J Clin Oncol 2007; 25(21): 3061-3068.

83-McLeod HL. Murray GI. "Tumour markers of prognosis in colorectal cancer". *Br J Cancer* 1999; 79(2): 191-203.

84-Jen J. Kim H. Piantadosi S. et al. "Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer". *N Engl J Med* 1994; 331(4): 213-221.

85-Lanza G. Matteuzzi M. Gafà R. et al. "Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer". *Int J Cancer* 1998; 79(4): 390-395.

86-Griffin MR. Bergstralh EJ. Coffey RJ. et al. "Predictors of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum". *Cancer* 1987; 60(9): 2318-2324.

87-Johnston PG. Fisher ER. Rockette HE. et al. "The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer". *J Clin Oncol* 1994; 12(12): 2640-2647.

88-Shibata D. Reale MA. Lavin P. et al. "The DCC protein and prognosis in colorectal cancer". *N Engl J Med* 1996; 335(23): 1727-1732.

89-Bauer KD. Lincoln ST. Vera-Roman JM. et al. "Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinomas". *Lab Invest* 1987; 57(3): 329-335.

90-Bauer KD. Bagwell CB. Giaretti W. et al. "Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer". *Cytometry* 1993; 14(5): 486-491.

91-Sun XF. Carstensen JM. Zhang H. et al. "Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma". *Lancet* 1992; 340(8832): 1369-1373.

92-Roth JA. "P53 prognostication: paradigm or paradox?". *Clin Cancer Res* 1999; 5(11): 3345.

93-Gryfe R. Kim H. Hsieh ET. et al. "Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer". *N Engl J Med* 2000; 342(2): 69-77.

94-Popescu RA. Norman A. Ross PJ. et al. "Adjuvant or palliative chemotherapy for colorectal cancer in patients 70 years or older". *J Clin Oncol* 1999; 17(8): 2412-2418.

95-Martin EW Jr. Minton JP. Carey LC. "CEA-directed second-look surgery in the asymptomatic patient after primary resection of colorectal carcinoma". *Ann Surg* 1985; 202(3): 310-317.

96-Bruinvels DJ. Stiggelbout AM. Kievit J. et al. "Follow-up of patients with colorectal cancer. A meta-analysis". *Ann Surg* 1994; 219(2): 174-182.

97-Lautenbach E. Forde KA. Neugut AI. "Benefits of colonoscopic surveillance after curative resection of colorectal cancer". *Ann Surg* 1994; 220(2): 206-211.

98-Khoury DA. Opelka FG. Beck DE. et al. "Colon surveillance after colorectal cancer surgery". *Dis Colon Rectum* 1996; 39(3): 252-256.

99-Safi F. Link KH. Beger HG. "Is follow-up of colorectal cancer patients worthwhile?". *Dis Colon Rectum* 1993; 36(7): 636-643; discussion 643-644.



100-Moertel CG. Fleming TR. Macdonald JS. et al. "An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer". JAMA 1993; 270(8): 943-947.

101-Rosen M. Chan L. Beart RW Jr. et al. "Follow-up of colorectal cancer: a meta-analysis". Dis Colon Rectum 1998; 41 (9): 1116-1126.

102-Desch CE. Benson AB 3rd. Smith TJ. et al. "Recommended colorectal cancer surveillance guidelines by the American Society of Clinical Oncology". J Clin Oncol 1999 ; 17(4): 1312.

103-Benson AB 3rd. Desch CE. Flynn PJ. et al. "2000 update of American Society of Clinical Oncology colorectal cancer surveillance guidelines". J Clin Oncol 2000; 18(20): 3586-3588.

104-"Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology". J Clin Oncol 1996; 14(10): 2843-2877.

105-Lechner P. Lind P. Goldenberg DM. "Can postoperative surveillance with serial CEA immunoscintigraphy detect resectable rectal cancer recurrence and potentially improve tumor-free survival?". J Am Coll Surg 2000; 191(5): 511-518.

106-Lonneux M. Reffad AM. Detry R. et al. "FDG-PET improves the staging and selection of patients with recurrent colorectal cancer". Eur J Nucl Med Mol Imaging 2002; 29 (7): 915-921.

107-Delbeke D. "Oncological applications of FDG PET imaging: Brain tumors, colorectal cancer, lymphoma, and melanoma". J Nucl Med 1999; 40: 591-603.

108-Ruers TJM. et al. "Value of positron emission tomography with [F-18]Fluorodeoxyglucose in patients with colorectal liver metastases: a prospective study". J Clin Oncol 2002; 20: 388-395.

109-Eberhart CE. Coffey RJ. Radhika A. Giardiello FM. Ferrenbach S. DuBois RN. "Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas". Gastroenterology 1994; 107: 1183-1188.

110-Kargmann SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. "Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer". *Cancer Res* 1995; 55: 2556-2559.

111-Bennett A, Tacca MD, Stamford IF, Zebro T. "Prostaglandins from tumours of human large bowel". *Br J Cancer* 1977; 35: 881-884.

112-Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M. "Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2". *J Biol Chem* 1999; 274: 11660-11666.

113-Simon LS. "Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin*". *Rheum* 1996; 8: 169-175.

114-Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hyland LM, Celano P. "Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis". *N Engl J Med* 1993; 328: 1313-1316.

115-Kawamori T, Rao CV, Seibert K, et al. “Chemopreventive activity of Celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis”. *Cáncer Res* 1998; 58: 409–412.

116-Reddy BS, Hirose Y, Lubet R, et al. “Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis”. *Cancer Res* 2000; 60: 293-297.

117-Steinbach G, Lynch PM, Phillips RKS, Wallace MH, Hawk E, Levin B. “The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor in familial adenomatous polyposis”. *N Engl J Med* 2000; 342: 1946-1952.

118-Sheng H, Shao J, Kirkland SC, et al. “Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2”. *J Clin Invest* 1998; 273: 2254-2259.

119-Gelman KA, Eisenhauer EA, Harris AL, Ratain MJ, Workman P. “Anticancer agents targeting signaling molecules and cancer cell environment: challenges for drug development?”. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1281-1287.

120-Pozharisski KM, Likhachev AJ, Klimashevski VF, Shaposhnikov JD. “Experimental intestinal cancer research with special reference to human pathology”. *Adv Cancer Res.* 1979; 30: 165-237.

121-Gilbert JM, MS Thesis. University of London, 1984

122-Nagasawa HT, Shiota FN, Matsumoto H. “Decomposition of methylazoxymethanol, the aglycone of cyccasin in D20”. *Nature* 1972; 236: 234–235.

123-Lorenz E, Stewart HL. “Intestinal carcinoma and other lesions in mice following oral administration of 1,2,5,6-dibenzanthracene and 20-methylcholanthrene”. *J. Natl Cancer Inst* 1941; 1: 17.

124-Walpole AL, Williams MHC, Roberts DC. “The carcinogenic action of 4-aminobiphenyl and 3:2,dimethyl-4-aminobiphenyl”. *Brit. J. Industr Med* 1952; 9: 255-263.

125-Laqueur GL, Spatz M (1968). "Toxicology of cycasin". *Cancer Research* 1968; 28: 2262-2267.

126-Laqueur GL. "The induction of intestinal neoplasma in rats with the glycoside cycasin and its aglycone". *Virchows Arch. Pathol. Anat* 1965; 340: 151-163.

127-Druckrey H. "Production of colonic carcinoma by 1,2,dialkylhydrazines and azoxyalkanes, en *Carcinoma of the colon and antecedent epithelium*", (W.J. Burdette, ed.), Charles C. Thomas Publisher, Springfield, IL 1970; pp.267.

128-Newberne PM, Rogers AE. "Animal model: DMH-induced adenocarcinoma of the colon in the rat". *Am. J. Pathol* 1973; 72: 541-544.

129-Matsumoto H, Higa HH. "Studies on methylazoxymethanol, the aglicone of cycasin: methylation of nucleic acids in vitro". *Biochem. J.* 1966; 98: 20-22.

130-Lamont JT, O'Gorman TA. "Experimental colon cancer". *Gastroenterology* 1978; 75: 1157-1169.

131-Toshihiko kawaman, Chinthalapally V. Rao, Karen Seibert y Bandaru S. Reddy. “Chemopreventive Activity of Celecoxib, a Specific Cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogénesis”. *Cancer Research* 1998; 58: 409-412.

132-Noguera Aguilar JF, Plaza Martínez A, Amengual Antich 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.

133-Reddy BS y Rao CV. “Colon cancer: a role for cyclooxygenase-2-specific nonsteroidal anti-inflammatory drugs”. *Drugs Aging* 2000; 16(5): 329-334.

134-Weiss H, Amberger A, Widschwendter M, Margreiter R, Ofner D, Dietl P. “Inhibition of store-operated calcium entry contributes to the antiproliferative effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human colon cancer cells”. *Int J Cancer* 2001; 92 (6): 877-882.

135-Rao CV, Rivernson A, Simi B, et al. “Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nosteroidal anti-inflammatory agent”. *Cancer Res* 1995; 55: 1464–1472.

136-Chan TA. “Non-steroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cáncer chemoprevention”. *Lancet Oncol* 2002; 3: 166–174.

137-Kune GA, Kune S, Watson LF. “Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study”. *Cancer Res* 1988; 48: 4399-4404.

138-Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Hara A, Shimizu M, Kuno T, Katayama M, Qiao Z y Mori H. “Supresión of Ocurrente and Advancement of beta-Catenin-accumulated Crypts, Possible premalignant lesion of colon cancer, by selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib”. *Jpn J. Cancer Res* 2001; Jun; 92(6): 617-623.

139-Vane JR, Bakle YS, Botting RM. “Cyclo-oxygenases 1 and 2”. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97-120.

140-Brooks P, Emery P, Evans JF, Fenner H, Hawkey CJ, Patrono C, et al. “Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2”. *Rheumatology* 1999; 38: 779-788.



141-Lipsky PE, Brooks P, Crofford LJ, DuBois R, Graham D, Simon LS, et al. “Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease”. *Arch Intern Med* 2000; 160: 913-920.

142-8 de 4 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: 337-45.

143-Sinicropo FA, Gill S. “Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer”. *Cancer Metastasis Rev* . 2004; 23(1-2): 63-75.

144-Gupta RA, Dubois RN. “Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2”. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 11–21.

145-Sheehan KM; Sheahan K, O’Donoghue DP, et al. “The relationship between cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer”. *Jama* 1999; 282: 1254-1257.

146-Chapple KS, Cartwright EJ, Hawcroft G, Tisbury A, Bonifer C, Scott N, Windsor ACJ, Guillou PJ, Markham AF, Coletta PL, Hull MA. "Localization of cyclooxygenase-2 in human sporadic colorectal adenomas". *Am J Pathol* 2000; 156: 545-553.

147-Sheng H, Shao J, Kirklan SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN. "Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2". *J Clin Investig*. 1997; 99: 2254-2259.

148- Koehne CH, Dubois RN. "COX-2 inhibition and colorectal cancer". *Semin Oncol* . 2004; 31: 12-21.

149-Masferrer JL; Leahy KM; Koki AT, Zweifel BS, Settle SL; Woerner M, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. "Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors". *Cancer Res*. 2000; 60: 1306-1311.

150-Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells". *Cell*. 1998; 93: 705-716.

151-Sheng H, Shao J, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN. "Modulation of apoptosis by prostaglandin treatment in human colon cancer cells". *Cancer Res.* 1998; 58: 362-366.

152-DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ. "Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors". *Gastroenterology* 1996; 110: 1259-1262.

153-Bamba H, Ota S, Kato A, Adachi A, Itoyama S, Matsuzaki F. "High expression of cyclooxygenase-2 in macrophages of human colonic adenoma". *Int J Cancer* 1999; 83: 470-475.

154-Davies G, Salter J, Margaret Hills, Martin L, Sacks N, Dowsett M. "Correlation between Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenesis in Human Breast Cancer". *Clinical Cancer Research.* 2003; 9: 2651–2656.

155-Williams CS, Mann M, DuBois R. "The role of cyclo-oxygenases in inflammation, cancer and development". *Oncogene* 1999; 18: 7908-7916.

156-Osima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. "Supresión of intestinal polyposis in APC Delta 716 Knoc Koymice by inhibition of ciclooxigenase-2 (COX-2)". Cell 1996; 87(5): 803-809.

157-Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, Taketo M.M. y Evans J.F. "Chemoprevention of intestinal polyposis in the APC Delta 716 mouse by Rofecoxib, a specifif cyclooxygenase-2 Inhibitor". Cancer Res 2001; 61(4): 1733-1740.

158-Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, et al. "Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the Apc gene". Science 1992; 256: 668-670.

159-Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G, Lubet RA. "The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis". Cancer Res 2000; 60: 5040-5044.

160-Evans JF. "Rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, is chemopreventive in a mouse model of colon cancer". Am J Clin Oncol 2003; 26 (4): 62-65.

161-Reddy BS, Rao CV, Seibert K. "Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis". *Cancer Res* 1996; 56: 4566-4569.

162-Wei M, Morimura K, Wanibuchi H, et al. "Chemopreventive effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis". *Cancer Letters* 2003; 202: 11-16.

163-Smalley WE, Dubois RN. "Colorectal cancer and nonsteroidal antiinflammatory drugs". *Adv pharmacol* 1997; 39: 1-20.

164-American Cancer Society: *Cancer Facts and Figures 2004*. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2004. Janne P y col. "Chemoprevention of colorectal cancer". *N Eng J med* 2000; 342: 1960.

165-Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G y Lubet RA. "The Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min Mouse model of adenomatous polyposis". *Cancer Research* 2000; 60: 5040-5044.

166-Lieberman DA. "Screening for colorectal cancer". Clin Cornerstone 2002; 4: 1-10.

167-Benamouzig R, Chaussade S. "La chimioprévention du cancer colorectal". Presse Med 2002; 31: 124-128.

168-Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, et al. "The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer". JAMA 1999; 282 (13): 1254-1257.

169-Arber N. "Do NSAIDs prevent colorectal cancer?" Can J Gastroenterol 2000; 14(4): 299-307.

170-Lipsky LP, Abramson SB, Crofford L, et al. "The classification of cyclooxygenase inhibitors". J Rheumatol 1998; 25(12): 2298-2303.

171-Tanaka, T. et al. "Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemoprevention colitis and formation of aberrant crypt foci in rats". Cancer Res 2001; 61: 2424-2428.

172-Fosslien, E., "Molecular Pathology of Cyclooxygenase-2 in neoplasia". *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2000; 30: 3-21.

173-Boone, C.W., et al. "Identification of candidate cancer chemopreventive agent and their evaluation in animal and human clinical trials: a review". *Cancer res* 1990; 50: 2-9.