

ACCIÓN DEL PIROXICAM EN RATONES REMBRAS CEPA C57BL16 CON MELANOMA B16F1

Belkis Quiñones¹. Eloísa Urbina de Velandia¹. Mima Pérez Feo²

¹Departamento de Farmacología y Toxicología. ²Unidad de Psiquiatría. Facultad de Medicina.

Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Resumen

El Melanoma Maligno es un cáncer cutáneo grave, cuya frecuencia ha aumentado rápidamente en los últimos años. Debido al éxito limitado de la quimioterapia en el tratamiento del Melanoma nos propusimos demostrar la acción del Piroxicam, un analgésico no esteroide, sobre el Melanoma B 16F1, tumor experimental ampliamente utilizado en el estudio de células cancerosas, para lo cual nos planteamos la hipótesis de que el Piroxicam administrado a ratones hembras de la cepa C57BL/6 inoculados con Melanoma B16F1 ejerce una acción antitumoral. Se utilizaron 33 ratones hembras de la cepa C57BL/6 distribuidos en dos grupos, un grupo tratado durante un mes con una dosis diaria de Piroxicam de 8 mg/kg y un grupo control el cual recibió una solución de agua destilada más el vehículo de la droga utilizada. Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba "t" de Student. Se demostró el Piroxicam no inhibió el desarrollo del Melanoma B16F1; por el contrario aumentó el crecimiento diario del tumor primario *in situ* y las dimensiones del tumor primario *in situ* y las dimensiones del tumor primario disecado, debido probablemente al efecto inhibidor de las prostaglandinas sobre la replicación celular del Melanoma B 16F1. Concluimos con estos resultados que el Piroxicam estimula el desarrollo del Melanoma B16F1 en ratones hembras de la cepa C57BL/6.

Palabras clave: Melanoma B16F1, Melanoma experimental, Tumor, Piroxicam Cepa C57BL/6.

Abstract

Piroxicam action on female mice C57BL/6 with Melanoma B16F1.

The Malignant Melanoma is a serious cutaneous cancer, its frequency has rapidly increased in the last years. Because the limited success of the chemotherapy in the treatment of the Melanoma we proposed to demonstrate the action of Piroxicam, a non-steroid analgesic, over the Melanoma B16F1, an experimental tumor widely used in the study of cancer cells. We proposed the hypothesis that Piroxicam administered in female mice of C57BL/6 inoculated with melanoma B16F1 has an antitumoral action. We used 33 female mice of C57BL/6 divided in two groups; one group was treated with a daily dose of Piroxicam (8mg/kg) and control group that received distilled water solution with addition of the vehicle of the drug administered. The results were analyzed using the Student "t" test. It was demonstrated that Piroxicam did not inhibit the development of Melanoma B 16F1. It increased the daily growing *in situ* of the primary tumor and the extension of primary tumor dissected, probably because of the inhibitory effects of the prostaglandines over the cell replication of the Melanoma B16F1. We conclude with these results that Piroxicam stimulates the Melanoma B16F1 development in female mice C57BL/6.

Key words: Melanoma B16F1, experimental melanoma, tumor, piroxicam, strain C57BL/6.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cutáneas son muy comunes en el ser humano. Las detectadas con mayor frecuencia son las afecciones de las glándulas sebáceas, la dermatofitosis seborreica, dermatitis atópica, el eccema, la ictiosis y los tumores cutáneos benignos y malignos (Stern, 1988). De estos últimos el Melanoma Maligno, se considera la forma más grave. Este Melanoma Maligno, se considera la forma más grave. Este Melanoma deriva de los melanocitos presentes en la capa de células basales de la epidermis (Katz, 1990) y su

aparición está asociada con una intensa e intermitente exposición a la luz solar ultravioleta (Rieber y Rieber, 1993).

El Melanoma Maligno es un tumor típico de la edad avanzada (Bartkowiak et al., 1991). Su comportamiento es impredecible y su pronóstico es reservado (Markowitz et al., 1991).

El tratamiento del cáncer consiste en la erradicación de las células tumorales del cuerpo, para lo cual existen cuatro instrumentos fundamentales como son la cirugía, la radioterapia, la bioterapia y la quimioterapia (Longo,

1990). En el tratamiento quimioterápico de los procesos malignos se emplean las drogas citotóxicas; éstas son drogas de baja especificidad antineoplásica, ya que su acción también se extiende a las células normales del organismo (Litter, 1986).

Para estudiar la quimioterapia antineoplásica se utilizan modelos tumorales en animales de experimentación. Los tumores desarrollados espontáneamente o inducidos químicamente ofrecen la ventaja de poder ser reproducidos en varias copias inéditas las cuales pueden ser tratadas con drogas (Giovanna y Fogh, 1985). El Melanoma B16F1 es un sistema tumoral experimental usado para estudiar las propiedades de las células cancerosas. Se originó espontáneamente en la cepa C57BL/6; se caracteriza por poseer poco potencial metastático a nivel pulmonar y gran selectividad para crecer rápidamente (Schirmacher, 1985).

Existe una asociación entre el sexo del huésped y el crecimiento tumoral de Melanoma Maligno; sin embargo, los reportes son contradictorios. En humanos se ha observado tendencia aumentada de la enfermedad en mujeres y mayor riesgo de tener cáncer secundario en mujeres con Melanoma que en hombres (Gutman et al., 1991). Markowitz et al. (1991) han señalado una predominancia leve en los hombres y mayor probabilidad de morir en el sexo masculino que en el femenino. Estas diferencias entre hombres y mujeres con Melanoma Maligno se han atribuido a mecanismos hormonales. Por lo que se ha sugerido que este tumor es hormono - dependiente (Markowitz et al., 1991).

En 1976, Proctor et al, demostraron una clara relación entre la función hormonal de ovarios intactos y el lento crecimiento "in vivo" del Melanoma B 16, al observar que después de la ovariectomía de ratones hembras C57B116, el crecimiento tumoral es más rápido que en los ratones hembras no sometidas a ovariectomía. Estos resultados permitieron sugerir que las hormonas sexuales femeninas suprimen el crecimiento tumoral del Melanoma B16.

Existe una relación entre los tumores neoplásicos y las prostaglandinas (Bennett, 1975; Jaffe 1974 citados por Reddy et al., 1987; Lau et al, 1987). Debido a que los analgésicos anti-inflamatorios no esteroides (AINE) actúan inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, el efecto de estas drogas sobre los tumores ha sido objeto de investigación.

En diferentes estudios se ha demostrado el efecto beneficioso de los AINE especialmente aspirina, indometacina y Piroxicam en la terapia de una variedad de tumores, tanto en humanos como en animales de experimentación (Fulton, 1984; Lala et al., 1986; Young y Hoover, 1986 citados por Valdez y Perdigón 1991; Reddy et al., 1987).

El Piroxicam es un AINE con gran capacidad para inhibir la síntesis de prostaglandinas (Carty et al., 1980). En trabajos realizados por varios autores se ha demostrado la acción antitumoral del Piroxicam sobre tumores gastrointestinales, cáncer de colon y fibrosarcoma (Nigro et al., 1986; Reddy et al., 1987; Northway et al., 1990; Valdez y Perdigón 1991). Ante la necesidad de investigar y hallar drogas con efectos tóxicos sobre las células sanas, nos propusimos demostrar la acción del Piroxicam sobre el Melanoma B 16F 1 en ratones hembras de la cepa C57BL/6.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 33 ratones hembras de la Cepa C57BL16, con peso aproximado de 18 gr. y de 8 semanas de edad, los cuales fueron obtenidos del Laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina. Para conservar sus endogamicidad se aparearon parejas de hermanos a partir de 50 parejas obtenidas originalmente del Jackson Laboratory Mainer (USA) a través del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (VIC) en el año 1977.

Los animales seleccionados se distribuyeron en 2 grupos, uno formado por 17 ratones hembras tratados con Piroxicam y otro formado por 16 ratones hembras

como grupo control Se ubicaron en jaulas y fueron alimentados durante el experimento con ratarina granulada y agua "Ad libitum".

El primer día del experimento los ratones del grupo tratado comenzaron a recibir por vía intraperitoneal una dosis diaria de Piroxicam de 8mg/kg de peso, preparado en solución acuosa de bicarbonato de sodio 0.1. N (Northway et., 1990), a una concentración de 0.16 mg de Piroxicam /ml de solución. De la misma forma los animales del grupo control comenzaron a recibir desde el primer día del experimento una solución acuosa de bicarbonato de sodio 0.1N.

Una semana después de iniciado el experimento, los animales de ambos grupos fueron inoculados con 50.000 células y viables de melanoma B 16F1 (Fidler y Nicolson, 1976; Hart y Fidler, 1980) en la pata derecha mediante inyección intramuscular siguiendo la técnica de exclusión de Axul Trypan (Malavé, 1978 citado por Urbina de V, 1980).

Para la recolección de los datos a partir del día de inoculación se midió diariamente el diámetro de la pata derecha de los animales en el sitio de la inyección con un vernier metálico, hasta el último día del experimento. Tres semanas después de la inoculación se sacrificaron los animales de ambos grupos (Hart y Fidler, 1980; Kimura y Xiang, 1986) mediante sobredosis de cloroformo y se disecó el tumor primario de cada animal. A los tumores primarios se les determinó el peso en gramos, utilizando balanza electrónica. El volumen tumoral se calculó en ml, sumergiendo el tumor en una probeta de 50 ml con agua destilada, correspondiendo el volumen tumoral desplazado por el tumor (Wood, 1954; citado por Urbina de V, 1980). Para determinar el diámetro geométrico se midió el largo, el ancho y el alto del tumor con un vernier: el diámetro geométrico se calculó como la raíz cúbica del producto de las medidas obtenidas (Stackpole et. al., 1991).

RESULTADOS

Con respecto al peso de los animales, en el grupo de

ratones hembras tratados, el peso inicial promedio fue de 18.23 ± 2.26 g y el peso final promedio fue de 19.08 ± 1.91 g con diferencia de 0.85g la cual no fue estadísticamente significativa ("t" de Student: -1.187 $P < 0.05$).

Para analizar la diferencia en el crecimiento del tumor primario "in situ" entre ambos grupos de animales, se comparó el promedio del diámetro correspondiente a los días 7, 14 y 22 de tratamiento post inoculación. El día 7 el diámetro de la pata fue $3.18 + 0.26$ mm y $3.06 + 0.13$ mm en el grupo de ratones hembras tratados y controles respectivamente, con diferencia entre ambos grupos de 0.12mm la cual no fue estadísticamente significativa ("t" de Student: 1.660, $P > 0.05$). El día 14 el promedio del diámetro de la parte fue de 5.44 ± 1.25 mm en el grupo de ratones hembras control, con una diferencia entre ambos grupos de 1.85mm, estadísticamente significativa ("t" de Student: 5.844, $P < 0.05$). El día 22, el promedio del diámetro tumoral fue $11.5 + 1.91$ mm en el grupo de ratones hembras control fue $11.62 + 2.39$ mm con una diferencia entre ambos grupos de 0.09mm la cual no fue estadísticamente significativa ("t" Student: -0.127, $P > 0.05$.)

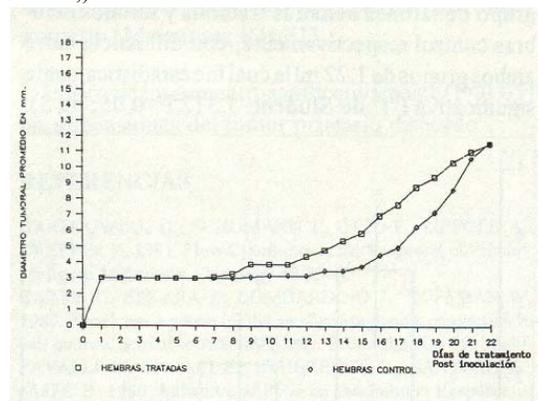


Fig. 1. Acción del Piroxicam en ratones hembras cepa C57BL/6 con Melanoma B16F1. Crecimiento tumoral diario in situ en milímetros, 17 ratones hembras tratadas y 16 control. Valores absolutos promedio

El peso promedio del tumor primario disecado fue 3.88 ± 1.08 g en el grupo de ratones hembras tratados y 2.5 ± 0.61 g en el grupo de ratones hembras control con diferencia de 1.38g la cual fue estadísticamente

significativa ("t" de Student:4.489, P<0.05).

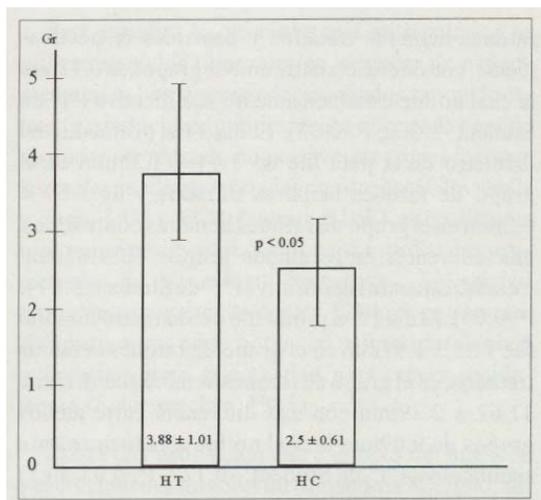


Fig.2. Acción del Piroxicam en ratones hembras cepa C57BL/6 con Melanoma B16F1. Tumor primario disecado. Peso en gramos. Ratones Hembras tratadas y control. Valores absolutos.

El volumen del tumor primario disecado tuvo un promedio de 3.53 + 1.29ml y 2.31 + 0.73ml en el grupo de ratones hembras tratadas y ratones hembras control respectivamente, con diferencia entre ambos grupos de 1.22 ml la cual fue estadísticamente significativa ("t" de Student: 3.3J2 P<0.05).

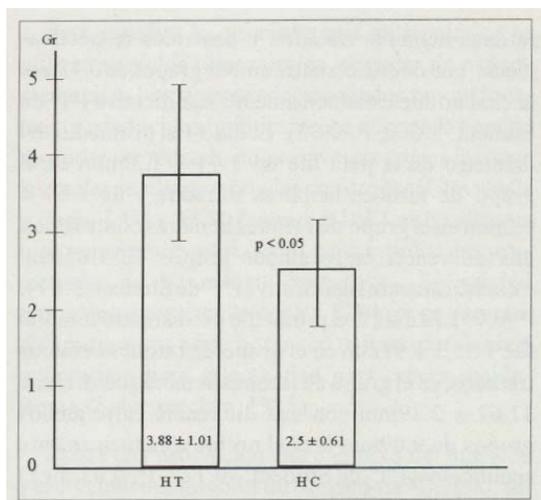


Fig.3. Acción del Piroxicam en ratones hembras cepa C57BL/6 con Melanoma B16F1. Tumor primario disecado. Volumen en milímetros. Ratones Hembras tratadas y control. Valores absolutos.

El promedio del diámetro geométrico del tumor primario disecado fue 18.3± 0.76 mm en el grupo de ratones hembras tratadas y en el grupo de ratones hembras control fue de 16.75 ± 1.39 mm con una diferencia de 1.60 mm, estadísticamente significativa ("t" de Student: 2.082, P<0.05 Fig. 4)

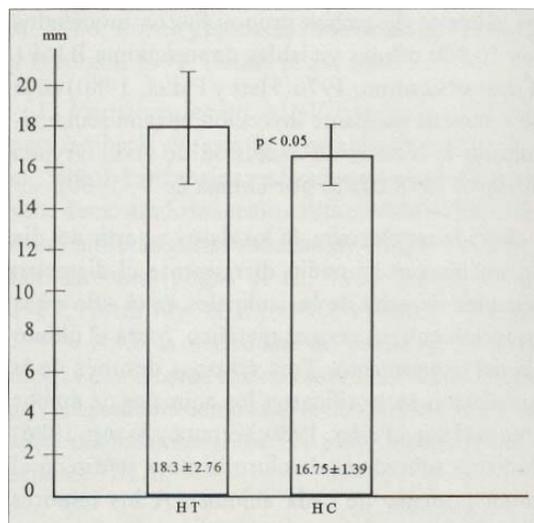


Fig.4. Acción del Piroxicam en ratones hembras cepa C57BL/6 con Melanoma B16F1. Tumor primario disecado. Diámetro geométrico en milímetros. Ratones Hembras tratadas y control. Valores absolutos.

DISCUSIÓN

Se observó un aumento de peso en ambos grupos lo cual se explica por el desarrollo del Melanoma B16F 1 en la pata de los animales, no obstante no se corresponde el aumento de peso de los animales con el peso promedio del tumor primario disecado, ya que el primero fue menor que el segundo; sin embargo, el aumento de peso sólo fue significativo (P<0.05) en los animales del grupo control, resultados coinciden con los reportados por Reddy et al, (1987), quienes observaron que el Piroxicam administrado en la dieta no afectó el peso de ratas machos con cáncer de colon.

En cuanto a la presencia del tumor primario, observamos que el Piroxicam inhibió el desarrollo del Melanoma B16F 1, en contraste con los reportes de estudios en los cuales se ha demostrado la acción inhibitoria del Piroxicam sobre la formación de tumores

en el intestino delgado y colon de ratas, así como la disminución en la incidencia de colonias neoplásicas y en el número de adenocarcinomas en ratas sometidas a irradiación pélvica (Pollard et al., 1983 1987; Northway et al., 1990).

Sobre el crecimiento del tumor primario "in situ" el Piroxicam estimuló el crecimiento diario del tumor primario el cual fue el mayor que en los animales del grupo control, durante la segunda y tercera semana del experimento, aunque con diferencia significativa ($P < 0.05$) solo para el día 14.

En cuanto a las dimensiones del tumor primario diseccionado observamos que los promedios de peso, volumen y diámetro geométrico fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) en el grupo de ratones hembras tratados con Piroxicam.

Nuestra hipótesis de trabajo se basó en el concepto de que los tejidos neoplásicos producen niveles mayores de prostaglandinas (PG) que los tejidos normales, esto ha sido demostrado tanto en humanos como en animales de experimentación portadores de neoplasias (Goodwin et al., 1980; Levine, 1981; Tilden y Balch, 1981; Laus et al., 1987; Valdéz y Perdigón, 1991). Existen evidencias que indican que las PG, especialmente la PGE, está involucrada en la iniciación, promoción y progresión de procesos tumorales en forma directa por su acción pro inflamatoria (Fischer, 1985; Trosko, 1985; Fletcher, 1989; citados por Valdéz y Perdigón, 1991; Goodwin et al., 1980) o indirectamente por afectar la respuesta inmune, ya que a través del aumento de PG, los tumores se hacen resistentes a las defensas inmunológicas del huésped (Goodwin et al., 1980; Tilden y Balch, 1981). Sin embargo, el rol pro-cáncer de la PGE no es evidente en todos los sistemas experimentales. Las PGE Inhiben la proliferación de linfocitos y el crecimiento de células tumorales en algunos modelos experimentales (Goodwin et al., 1980), de tal manera que en estos modelos, la administración de medicamentos inhibidores de la síntesis de PG estimulan el crecimiento tumoral. Existen evidencias que las drogas que

inhiben la síntesis de PG pueden inhibir o estimular el crecimiento tumoral, lo cual depende de la línea celular sobre la cual actúen estas drogas y de la dosis utilizada. Probablemente los resultados obtenidos en la presente investigación se deben al posible efecto inhibitorio de las PG sobre la replicación celular del Melanoma B16F1, razón por la cual el Piroxicam aumentó las dimensiones tumorales, lo cual coincide con los resultados de trabajos realizados por otros autores (Santore et al., 1976; Favalli et al., 1980) quienes observaron que la proliferación celular del melanoma B 16 "in vitro e in vivo, aumentó significativamente con la administración de Indometacina e Hidrocortisona (drogas Inhibidoras de la síntesis de PG). Mientras que la administración de un análogo de la PGE Inhibió la replicación celular de Melanoma B16 "in vitro in vivo" en ratones hembras C57BL/6 (Santoro et al., 1977).

CONCLUSIONES

- 1.El Piroxicam administrado a la dosis de 8 mg/kg de peso no afectó significativamente ($P < 0.05$) el peso de los ratones hembras C57BL/6 con Melanoma B16F1.
- 2.El Piroxicam no Inhibió el desarrollo del tumor primario (Melanoma B16F1).
- 3.El Piroxicam aumentó significativamente ($P < 0.05$) las dimensiones del tumor primario diseccionado.

REFERENCIAS

- BARTKOWIAK D., SCHUMANN J., OTTO F., LIPPOLD A., DREPPER H 1991. Flow Cytometry in the Prognosis of Primary Malignant Melanoma. *Oncology* 48: 39-42.
- CARTY T., ESKARA J., LOMBARDINO J., HOFFMAN W. 1980. Piroxicam, a potent inhibitor of prostaglandin production in cell culture. *Structure Activity Study. Prostaglandins* 19: 51-59.
- FAVALLI C., GARACI E., ETHEREDGE E., SANTORO G., JAFFE B. 1980. Influence of PGE on the Immune Response in Melanoma Bearing Mice. *Immunology* 125: 897-902.
- FIDLER 3., NICOLSON O. 1976. Brief Communication: Organ Selectivity for Implantation Survival and Growth of B16 Melanoma Variant Tumor Lines. *National Cancer Institute* 78:735-741.
- GIOVANELLA B., FOGHH 3. 1985. The Nude Mouse

- in Cancer Research. *Adv. Cancer Res* 44:69-120.
- GOODWIN J., HUSBY G., WILLIAMS R. 1980. Prostaglandin E. and Cancer Growth. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 897-902
- GUIMAN M., CNAAN A., INVAR. M, SHAFIR R, CHALCHICK S, ROZIN R., KLAUSNER J. 1985. Are Malignant Melanoma Patients at Higher Risk for a Second Cancer? *Cancer* 68: 660665.
- HART I., FIDLER I. 1980. Role of Organ Selectivity in the Determination of Metastasis Patterns of B16 Melanoma. *Cáncer Res.* 40:2281-2287.
- KATZ S. 1990. Enfoque del Tratamiento de los Cánceres de la Piel. En: Kelly W. *Medicina Interna. Tomo 1. Editorial Médica Panamericana.* 10p. 1379-1383.
- KIMURA A., XIANG 1986. High levels of Met-72 Antigen Expression: Correlation with Metastasis Activity of B16 Melanoma Tumor Cell Variants. *3. National Cancer Institute* 76: 1247-1254.
- LAU S., McMAHON J., McMENAMIN M., SCHUTLER H., BOYDM. 1987. Metabolism of Arachidonic Acid in Human Lung Cancer Cell Lines. *Cáncer Res.* 47: 3757-3762.
- LEVINE L., 1981. Arachidonic Acid Transformation And Tumor Production. *Adv. Cancer Res.* 35:49-79.
- LITTER M., 1988. Quimioterapia del Cáncer. *Farmacología Experimental y Clínica.* 7ma. Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires. 1740-1761.
- LONGO D. 1990. Principios del Tratamiento del Cáncer. En: Kelly W. *Medicina Interna. Edit Médica Panam.* pp. 1308.
- MARCOWITZ J., CUSIMIL., CAREY R., KANG S., PAUYK C., SUBER A., COSIMI B. 1991. Prognosis After Initial Recurrence of Cutaneous Melanoma. *Arch. Surgery* 126: 703-708.
- NIGRO N., BULL A, BOYO M. 1986. Inhibition of Intestinal Carcinogenesis in Rats: Effect of Difluoromethylornithine with Piroxicam on Fish oil. *J. National Cancer Institute* 77: 1309-1313.
- NORTHWAY M., SCOBAY M., CASSIDY T., GEISNGER K. 1990. Piroxicam Decreases Post irradiation Colonic Neoplasia in the Rat *Cancer* 766: 2300-2305.
- POLLARD M., LUCKERT P., SCHMIDT M. 1983. The suppressive effect of Piroxicam on Autochthonous Intestinal Tumor in the Rat. *Cancer Letters* 21: 57-61.
- PROCTOR J., AUCLAIR B., STOKOWSKI L. 1976. Brief Communication: Enocrine Factors and the Growth and Spread of B16 Melanoma. *J. National Cancer Institute* 57: 1197-1198.
- REDDY B., MASUYAMA II., KELLOFG. 1987. Dose related Inhibition of Colon Carcinogenesis by Dietary Piroxicam a No steroidal Anti-inflammatory Drug during Different Stages of Rat colon Tumor Development. *Adv. Cáncer Res.* 47: 5340-5346.
- RIEBER M., RIEBER M. 1993. Specific Tyrosinases Associated with Melanoma Replicative Senescence and Melanogenesis. *Adv. Cancer Res.* 53: 2469-2471.
- SANTORO FG., PHILPOTT G., JAFFE B. 1977. Inhibition of B16 Melanoma Growth in vivo by Synthetic Analogo of Prostaglandina E2. *Adv. Cáncer Res.* 37: 3774-3779.
- SCHIRRMACHER V. 1985. Cancer Metastasis: Experimental Approaches. Theoretical Concepts and Impacts of Treatment Strategies. *Adv. Cancer Res.* 43: 1-17.
- STACKPOLEC., VALLE E., ALTERMAN A. 1991. B16 Melanoma Metastasis to an "Artificial Organ" implant *Adv. Cancer Res.* 51: 2444-2450.
- STERN, R., 1988. Epidemiología de las Enfermedades cutáneas. En: Fitzpatrick T., Eisen A., Wolff K., Freedberg J., Austen F. *Dermatología En: Medicina General.* 3era. Edición. Vol. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 6-9.
- TILDEN A., BALCH C. 1981. Indomethacin Enhancement of Immunocompetence in Melanoma patients. *Surgery* 90: 78-84.
- URBINA DE VELANDIA E. 1980. Influencia de la Indometacina sobre el Carcinoma Pulmonar de Lewis (3LL) en ratones de la Cepa C5713L/6. 47p. Trabajo de ascenso (Profesor Agregado). Universidad de Los Andes. Facultad de Medicina. Escuela de Medicina. Mérida.
- VALDEZ J., PERDIGONO. 1991. Piroxicam, Indomethacin and Aspirin Action on a Murine Fibrosarcoma Effects on Tumor Associated and Peritoneal Macrophages. *Clinical and Experimental Immunology* 86: 315-321.