



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

HELOÍZA PARANZINI BORDINI

**EFEITO PROTETOR DA METFORMINA EM MODELO DE  
CRIPTAS ABERRANTES INTESTINAIS INDUZIDAS POR 1,2-  
DIMETILHIDRAZINA**

---

Londrina  
2015

HELOÍZA PARANZINI BORDINI

**EFEITO PROTETOR DA METFORMINA EM MODELO DE  
CRIPTAS ABERRANTES INTESTINAIS INDUZIDAS POR 1,2-  
DIMETILHIDRAZINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz

Londrina  
2015

B729e Bordini, Heloíza Paranzini.

Efeito protetor da metformina em modelo de criptas aberrantes intestinais induzidas por 1,2-dimetilhidrazina / Heloíza Paranzini Bordini. – Londrina, 2015.

60 f. : il.

Orientador: Rodrigo Cabral Luiz.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2015.

Inclui bibliografia.

I. Colon – Câncer – Teses. 2. Câncer – Prevenção – Teses. 3. Metformina – Teses. I. Luiz, Rodrigo Cabral. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-006.6

HELOÍZA PARANZINI BORDINI

**EFEITO PROTETOR DA METFORMINA EM MODELO DE CRIPTAS  
ABERRANTES INTESTINAIS INDUZIDAS POR 1,2-  
DIMETILHIDRAZINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr Rodrigo Cabral Luiz  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Ivete Conchon Costa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Jair Tonon  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de julho de 2015.

Dedico aos meus pais,  
pela confiança, apoio, incentivo e amor.  
A vocês, minha eterna e imensurável gratidão.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo presente de todos os dias: a vida. Agradeço por sempre me abençoar com bons momentos e guiar nos momentos difíceis. Por tudo, a Ti sou grata.

Aos meus pais, Rosa e José Luis, meus verdadeiros mestres. Agradeço pela paciência, dedicação, o incentivo de sempre ir mais longe, e principalmente, pela confiança, por acreditarem na minha capacidade quando eu duvidei de mim mesma. Sem o apoio de vocês não teria chegado até aqui. “Se hoje enxergo longe, é porque fui colocado em ombros de gigantes.” Amo vocês!

A minha irmã, Helenize. Obrigada pelo companheirismo, amor, pelos bons momentos e por ser minha grande amiga.

Aos meus avós, pessoas admiráveis. Agradeço por todo amor e pelos seus ensinamentos. Obrigada por continuarem olhando por mim, ao lado de Deus.

Ao meu namorado, Rhelmuthe. Obrigada pelo apoio, pela paciência e por segurar minha mão nos momentos difíceis e por compartilhar comigo momentos incontáveis de alegria. Tenho a sorte de ter encontrado em você, o meu companheiro, melhor amigo e amor.

A minha amiga, Juliana Lima. Agradeço pela longa amizade, pelos bons momentos e, mesmo não nos vendo com tanta frequência, por continuar torcendo por mim.

Aos colegas de laboratório, Gabriella Melo, Jean Kremer e Tatiane Fagundes. Agradeço por sempre serem solícitos em me ajudar, pelas conversas e pela amizade que construí com cada um de vocês.

Aos técnicos de laboratório, Jesus (Zui) e Pedro, por toda a ajuda oferecida durante este processo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz, por ter aberto as portas do laboratório para mim e me aceitado como orientanda de mestrado, por me transmitir seus

conhecimentos, e pela oportunidade que me deu de poder fazer algo tão fascinante, como a pesquisa científica.

Aos demais docentes, e todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível, muito obrigada.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

“Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência; ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tivesse o amor, eu não seria nada.”

Cor 13,2.

BORDINI, Heloíza Paranzini; LUIZ, Rodrigo Cabral. **Efeito protetor da metformina em modelo de criptas aberrantes intestinais induzidas por 1,2-dimetilhidrazina**. 2015. 37 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais frequente no mundo. Nos últimos anos, estudos têm revelado efeito protetor da metformina (MET - agente anti-hiperglicêmico utilizado no tratamento de diabetes tipo 2) contra o CCR. O efeito protetor da MET tem sido associado à ativação da AMPK (e inibição da mTOR), resultando em supressão da síntese de proteínas e redução na proliferação celular de células malignas. Este trabalho avaliou o efeito protetor da MET em um modelo de CCR induzido por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em camundongos fêmeas Balb/c. O tratamento simultâneo/contínuo (administração de MET e DMH simultaneamente) demonstrou atividade protetora da MET, prevenindo a formação de focos de criptas aberrantes (FCA) em 71.4% na porção distal do intestino, e foi capaz de restaurar os níveis basais de apoptose e prevenir eventos associados à displasia. O tratamento com MET se mostrou eficiente em modular o processo inflamatório induzido pela DMH, resultando em níveis reduzidos de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e nitrosativo.

**Palavras-chave:** Câncer colorretal. Metformina. 1,2-dimetilhidrazina. Focos de criptas aberrantes. Prevenção.

BORDINI, Heloíza Paranzini; LUIZ, Rodrigo Cabral. **Protective effect of metformin in a aberrant crypt foci model induced by 1,2-dimethylhydrazine**. 2015. 37 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

### **ABSTRACT**

Colorectal Cancer (CRC) is the third most frequent cancer in the world. In the last few years, studies have revealed a protective effect of metformin (MET - an anti hyperglycemic drug, used in the treatment of type 2 diabetes), against CRC. The protective effect of MET has been associated with AMPK activation (and mTOR inhibition), resulting in suppressed protein synthesis, and reduced cell proliferation in malignant transformed cells. The present study evaluated the protective effect of MET in a CRC model induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in Balb/c female mice. The simultaneous/continuous treatment (administration of MET and DMH simultaneously), revealed protective activity of MET, preventing the formation of aberrant crypt foci (ACF) in 71.4% at distal colon sections, and was able to restore basal levels of apoptosis, and prevent dysplastic associated events. Treatment with MET was efficient in modulating the inflammatory process induced by DMH, resulting in lower levels of oxidative stress and nitric oxide related molecules.

**Key words:** Colorectal cancer. Metformin. 1,2-dimethylhydrazine. Aberrant cypt foci. Prevention.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Etapas da carcinogênese.....	14
<b>Figura 2</b> – Modelo da evolução adenoma-carcinoma.....	15
<b>Figura 3</b> – Fórmula estrutural da metformina.....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCR	Câncer colorretal
INCA	Instituto Nacional de Câncer
FAP	Polipose adenomatosa familiar
HNPCC	Câncer colorretal hereditário sem polipose
WCRF	World Cancer Research Found
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
NO	Óxido nítrico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMH	1,2-dimetilhidrazina
MAM	Metilazoximetanol
FCA	Focos de criptas aberrantes
COX-2	Ciclooxigenase 2
MET	Metformina
DM2	Diabetes melitus tipo 2
AMPK	Adenosine-monophosphate-activated protein cinase
ATP	Adenosina trifosfato
AMP	Adenosina monofosfato
LKB1	Liver kinase B1
mTOR	Mammary target of rampamicin
IGF	Inulin-like growth factor
ALT	Alanina transaminase
NFkB	Nuclear factor kappa B
Nrf2	Nuclear factor E2-related factor 2

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1.	CÂNCER COLORRETAL – INCIDÊNCIA E FATORES DE RISCO .....	12
1.2.	CARCINOGÊNESE COLORRETAL .....	13
1.2.1.	Estresse Oxidativo no Câncer.....	15
1.3.	INDUÇÃO DE CRIPTAS ABERRANTES PELO MODELO DE DMH .....	16
1.4.	QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER.....	18
1.5.	METFORMINA .....	19
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO .....	23
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	24
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
	<b>ANEXOS</b> .....	34
	ANEXO A – Artigo Científico .....	35
	ANEXO B – Carta de aprovação do Comitê de Ética .....	63

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1.	Câncer Colorretal – Incidência e fatores de risco .....	12
1.2.	Carcinogênese Colorretal .....	13
1.2.1.	Estresse oxidativo no câncer.....	15
1.3.	Indução de criptas aberrantes pelo modelo de DMH .....	16
1.4.	Quimioprevenção do câncer .....	18
1.5.	Metformina .....	19
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	23
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	24
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
<b>ANEXOS</b>		
	ANEXO A – Artigo Científico .....	35
	ANEXO B – Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	63

## 1. Introdução

### 1.1. Câncer Colorretal – incidência e fatores de risco

O termo câncer se refere ao conjunto de doenças resultantes do descontrole do ciclo de replicação celular, que resulta em um tecido proliferativo com características invasivas. Mundialmente, o câncer tem sido responsável por inúmeros casos de morte. Para o ano de 2012 foram contabilizadas 8,2 milhões de mortes por câncer. Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) tem recebido bastante atenção, por ser o terceiro tipo de câncer mais frequente no mundo (GLOBOCAN, 2012).

Somente para o ano de 2014 foram estimados 15.070 novos casos para homens e 17.530 casos para mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15,44 casos novos a cada 100 mil homens e 17,24 a cada 100 mil mulheres, sendo que 95% dos casos são diagnosticados na forma de adenocarcinoma (INCA, 2014).

Considerada uma neoplasia maligna, o CCR acomete a mucosa intestinal tanto dos cólons, quanto do reto, e é geralmente classificado em hereditário e esporádico. O CCR hereditário resulta da transmissão familiar de mutações genômicas que podem aumentar em 80% a chance do desenvolvimento deste tumor. Os dois tipos mais frequentes de CCR hereditário são a polipose adenomatosa familiar (FAP) e o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), e juntas representam cerca de 20% dos casos de CCR (VALADÃO & CASTRO, 2007). O CCR esporádico é caracterizado pela ausência de mutação prévia no genoma, atinge cerca de 80% dos pacientes e é influenciado por aspectos ambientais e inflamatórios. O destaque do CCR esporádico é relativo à sua epidemiologia, com cerca de 1,4 milhões de casos novos em 2012, totalizando 9,7% dos casos de câncer no mundo (WCRF, 2013). Deste modo, o presente trabalho terá como foco o CCR esporádico.

Para o CCR esporádico, os sinais e sintomas mais comuns são: sangramento anal ou sangue nas fezes, alteração do trânsito intestinal (diarréia e obstipação alternados), dor ou desconforto abdominal, fraqueza e anemia e perda de peso sem causa aparente (INCA, 2003). O estilo de vida moderno parece ser o grande promotor da crescente incidência do CCR e por este motivo este tipo de câncer é mais comum em países economicamente desenvolvidos (JEMAL *et al.*, 2010), nos quais se observa modificações na cultura alimentar, que incluem a substituição de uma dieta saudável composta de frutas frescas, vegetais e produtos integrais, por uma alimentação rica em grãos refinados (como a farinha de trigo) (LALAND *et al.*, 2010), ingestão de carnes vermelhas e embutidos (PÉREZ CUETO, 2011; ASTON *et al.*,

2012; MIRVISH *et al.*, 2002), alimentos ricos em ferro, gordura animal e açúcares (PÉREZ CUETO, 2011).

Um interessante exemplo de fator de risco para o CCR esporádico é o consumo de carne vermelha. Em excesso, o grupamento heme presente na mioglobina da carne se comporta com um agente nitrosante e gera compostos carcinogênicos n-nitrosos (PERICLEOUS *et al.*, 2013), além de espécies reativas de oxigênio (ERO) e inflamação da mucosa intestinal (KNOBEL *et al.*, 2007).

Outros fatores de risco relacionados ao CCR esporádico são: (i) sedentarismo, (ii) doenças inflamatórias (OLIVEIRA & AARESTRUP, 2012), (iii) obesidade, devido a maus hábitos alimentares e à resistência periférica à insulina (SILVA, 2006), (iv) tabagismo e alcoolismo (PÉREZ CUETO, 2011; ROLÃO *et al.*, 2011). A identificação dos fatores de risco é importante, pois, deste modo, é possível agir de maneira preventiva, evitando-os e criando hábitos mais saudáveis, a fim de diminuir a incidência do CCR esporádico (DURKO & MALECKAS-PANA, 2014).

Um ambiente intestinal exposto a agentes carcinogênicos, estresse oxidativo e processo inflamatório, favorece o surgimento de células geneticamente modificadas. Para o CCR acredita-se que as primeiras mutações ocorrem nos proto-oncogenes *K-ras* e *APC* nos estágios iniciais, e em estágios mais tardios, observam-se alterações nos supressores tumorais *DCC* e *TP53* (TAKAHASHI & WAKABAYASHI, 2004). Mutações em outros genes como o *GSK-3 $\beta$*  e da  $\beta$ -catenina também estão envolvidas neste tipo de câncer (RUBINFELD *et al.*, 1997).

## 1.2. Carcinogênese Colorretal

A carcinogênese é o processo de desenvolvimento de neoplasias e tradicionalmente é considerado um evento de múltiplas etapas, que envolvem a iniciação, promoção e progressão (PITOT, 1989) (Fig. 1).

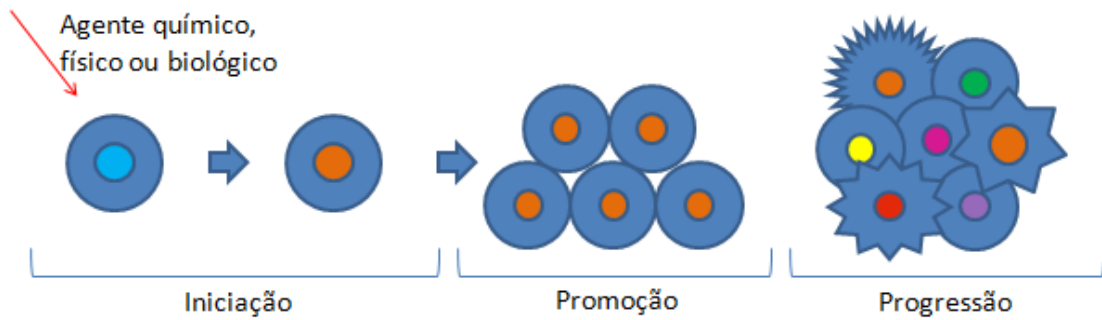


Figura 1 – Etapas da carcinogênese.

Para o CCR esporádico o modelo mais conhecido de carcinogênese colorretal é o proposto por VOGELSTEIN *et al.* (1996) (Fig. 2). A iniciação é primeira fase de transformação celular, onde uma célula normal sofre ação de um agente mutagênico, gerando lesões no material genético celular que podem resultar em mutações em proto-oncogenes ou genes supressores tumorais. A maioria dos compostos iniciadores apresenta ação indireta, isto é, precisa passar por biotransformação para que seus metabólitos possam atuar sobre o genoma celular (CHUN *et al.*, 2013). Para o intestino podemos citar como exemplo, de agentes iniciadores os derivados do azobenzeno, compostos alquilantes e nitrosaminas (HIGA, 2007).

Na promoção, a mutação induzida anteriormente é expressa fenotipicamente, isto é, a célula não sofre novas mutações, mas é estimulada a entrar em divisão celular (PITOT, 1993). Com o contato prolongado e contínuo com o agente oncopromotor, a célula anteriormente iniciada forma uma pequena massa de células que contém a mutação inicial. Contudo, na ausência de mutações em genes reguladores de apoptose, por exemplo, esta pequena população de células pode regredir, sendo, portanto, um processo reversível (INCA, 2014). No intestino estas células aparecem na forma de criptas aberrantes, que podem ou não apresentar displasia. Caso apresentem, é devido a novas mutações que estão surgindo, ou seja, é início da progressão (CADERNI *et al.*, 2003). Um exemplo de agente promotor são os derivados dos sais biliares, que têm mostrado relação com o desenvolvimento de CCR, principalmente em indivíduos com dieta rica em gordura. A exposição excessiva dos sais biliares pode provocar danos no epitélio intestinal, relacionados com a geração de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), que por sua vez, podem causar danos ao material genético das células (AJOUZ *et al.*, 2014).

As células que inicialmente se localizavam nas criptas passam a formar massas teciduais hiperplásicas que evoluem para adenomas (Fig. 2). O acúmulo de novas mutações

permite o aparecimento do carcinoma durante o processo de progressão. Nesta fase as células apresentam maior facilidade para entrar em mitose e características heterogêneas decorrente da instabilidade genômica (PITOT, 1989). Ainda dentro do processo de progressão é possível observar angiogênese e invasão de tecidos adjacentes, além de metástase (CHUN *et al.*, 2013; VOLGESTEIN & FEARON, 1990; COTTI *et al.*, 2000; PINHO, 2008).

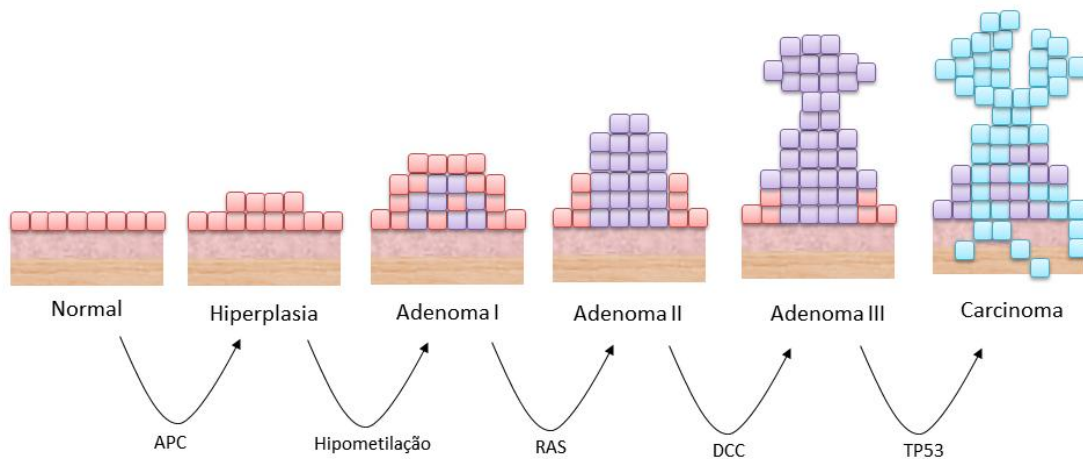


Figura 2 - Representação do modelo proposto por Vogelstein (1996) para a sequência de mutações na evolução adenoma-carcinoma, com alterações nos genes APC (*adenomatous polyposis coli*), RAS (*rat sarcoma*), DCC (*deleted in colorectal carcinoma*) e TP53 (proteína p53).

### 1.2.1. Estresse oxidativo no câncer

Dentro do processo de carcinogênese colorretal, o estresse oxidativo tem demonstrado forte envolvimento. O estresse oxidativo ocorre quando as defesas antioxidantes, sejam elas enzimáticas ou não enzimáticas, não são suficientes para controlar ou neutralizar a quantidade de radicais livres sendo formada, fazendo com que haja prevalência destas moléculas (PRYOR & GODBER, 1991), que por sua vez, são altamente instáveis e quimicamente reativas (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Quando existe este desbalanço, estas espécies reativas podem provocar diversas doenças, entre elas o câncer (INDO *et al.*, 2015).

Radicais livres são definidos como átomos ou moléculas que contém um número ímpar de elétrons na última camada eletrônica, que lhes confere a alta reatividade. Um exemplo são as ERO, que são formadas durante o metabolismo aeróbico, podendo dar origem a intermediários reativos, como radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Em condições fisiológicas normais, as ERO possuem função na resposta imunológica (fagocitose e defesa

contra infecções), e também atuam como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (BIESALSKI, 2002). Mas em excesso podem acarretar em lesões teciduais ou modificações nas respostas celulares (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

Além das ERO, também podem ser formadas espécies reativas de nitrogênio (ERN), dentre elas o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (CHANG *et al.*, 2015). O óxido nítrico pode modular vias de sinalização agindo de forma direta ou indireta. Em concentrações baixas, o NO pode agir como neurotransmissor no sistema nervoso central, regular o processo de contração e relaxamento dos esfíncteres do trato gastrointestinal e também tem função no controle do relaxamento dos vasos sanguíneos (BILLIAR, 1995). Por outro lado, em níveis mais elevados (ESPEY *et al.*, 2000), O NO reage com o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , formando o  $\text{ONOO}^-$  que é uma molécula de grande potencial citotóxico com habilidade de destruir patógenos e contribuir para a defesa imune. Além disso, o  $\text{ONOO}^-$  pode provocar danos em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como o câncer (KONDO *et al.*, 2002).

Um das consequências do estresse oxidativo é a geração de lesões no DNA que estão relacionadas ao processo de iniciação da carcinogênese (VALKO *et al.*, 2006), através de quebras simples ou duplas na cadeia de DNA, mutações e aberrações cromossômicas, contribuindo para o desenvolvimento de neoplasias (OSHIMA *et al.*, 2003).

### **1.3. Indução de criptas aberrantes pelo modelo de DMH**

Devido à importância epidemiológica do CCR esporádico, modelos experimentais têm sido desenvolvidos para compreender esta doença e avaliar agentes antitumorais e/ou quimiopreventivos. Um dos modelos experimentais mais utilizados é a indução de criptas aberrantes em animais, através da administração da 1,2-dimetilhidrazina (DMH), um agente carcinogênico iniciador indireto, derivado do azobenzeno, cujos metabólitos apresentam grande afinidade pelo tecido intestinal (YOSHIDA *et al.*, 2007).

A DMH teve seu potencial carcinogênico descoberto em um estudo com moradores do Guame (Micronésia), que consumiam farinha de cica (*Cycas circinalis*) (ROSENBERG *et al.*, 2009). Ao alimentar ratos com grandes quantidades da farinha de cica, LAQUEUR (1964), observou o desenvolvimento de adenocarcinomas no cólon destes animais, associados a presença de cicasina, uma hidrazina similar a metilazoximetanol (MAM).

Hidrazinas sintéticas podem ser encontradas no ambiente devido ao seu uso na indústria (fabricação de combustíveis), na agronomia (maturador de plantas), e na medicina (agente antineoplásico procarbazina), e suas diferentes formas podem induzir o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (TOTH, 1975). Também estão presentes na natureza de forma restrita em alguns cogumelos, folhas de louro e no tabaco. O potencial carcinogênico das hidrazinas é comparado a carcinógenos químicos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos N-nitrosos e aminas aromáticas (TOTH, 2005).

A DMH é um composto químico com conhecido potencial carcinogênico, que, uma vez metabolizada na sua forma ativa, instala-se no intestino (SWENBERG *et al.*, 1979), onde o metabólito ativo irá provocar alquilação no DNA e, conseqüentemente, a indução do câncer de cólon (YOSHIDA *et al.*, 2007).

Na primeira etapa de metabolização, a DMH dá origem ao azoximetano, que é metabolizado no fígado via CYP 2E1, para gerar metilazoximetanol (MAM). Ainda no fígado, o MAM é conjugado pelo ácido glicurônico e é liberado no cólon via bile. No intestino, o MAM é desconjugado pelas enzimas  $\beta$ -glicuronidase, e uma vez livre no intestino, o MAM é metabolizado e forma o íon metildiazônio, que por sua vez, gera o íon carbônio, seu composto carcinógeno ativo, sendo responsável pela metilação de ácido nucléico, desencadeando o processo de carcinogênese colorretal (ROSENBERG *et al.*, 2009).

Após submetidos ao tratamento com DMH, roedores apresentam lesões precursoras do desenvolvimento de câncer de cólon e reto (DIEHL *et al.*, 2006), como um conjunto de criptas com morfologia anormal (RUDOLPH *et al.*, 2005).

Estas lesões provocadas no intestino foram descritas pela primeira vez por BIRD (1987), como focos de criptas aberrantes (FCA), que são as primeiras lesões pré-neoplásicas do CCR. Tais lesões são de importante identificação na mucosa intestinal humana, para que se tenha um método de controle e prevenção de CCR precoce, ao invés de considerar somente pólipos e adenomas, como precursoras do CCR, já que são lesões mais tardias.

VIVONA *et al.* (1993) e McLELLAN *et al.* (1991), mostram que FCA podem conter elementos sugestivos de câncer de cólon, tais como elementos de displasia e a expressão de mutações no oncogene *ras* e no gene supressor *apc*, podendo progredir para um câncer (STEVENS, 2006).

As variações histológicas e moleculares nas criptas são muito comuns às dos tumores induzidos nas cobaias, permitindo que os FCA sejam considerados confiáveis para a avaliação pré-clínica de agentes quimiopreventivos que se deseja estudar (VIVONA *et al.*, 1993; BRUCE, 1990; PEREIRA & KHOURY, 1991).

Por ser um modelo experimental de relativo baixo custo e de curta duração, a indução de criptas aberrantes em animais, tem sido utilizada para identificar agentes quimiopreventivos contra o CCR esporádico (De FLORA *et al.*, 2001).

#### 1.4. Quimioprevenção do câncer

De modo geral, os cânceres esporádicos têm aumentado sua incidência com o decorrer dos anos, por este motivo varias pesquisas científicas têm tentado identificar compostos químicos naturais ou sintéticos capazes de exercer atividade quimiopreventiva sobre o câncer, isto é, prevenir o aparecimento do câncer ao inibir alguma das etapas de carcinogênese (KELLOFF *et al.*, 2004; SURH, 2003).

De FLORA *et al.* (2001) classificaram os agentes quimiopreventivos em agentes de ação primária, secundária e terciária. Os agentes de ação primária evitam iniciação do câncer, seja de maneira intra ou extracelular ou inibem a promoção. Os de ação secundária inibem a progressão de lesões pré-malignas, enquanto os de ação terciária evitam metástases ou recidivas dos tumores malignos.

Posteriormente STEWARD & BROWN (2013) sugerem a classificação dos agentes quimiopreventivos em bloqueadores e supressores. Os agentes bloqueadores atuam impedindo a lesão inicial da célula seja por sequestrar os radicais livres (*scavengers*), induzir reparo de DNA, e bloquear a captação de um composto cancerígeno. Já os supressores atuam sobre as células transformadas alterando a expressão gênica, inibindo a expansão clonal das células, induzindo a apoptose em lesões pré-neoplásicas ou modulando a transdução de sinais.

As fibras alimentares são os mais conhecidos agentes de prevenção do CCR. Primeiramente as fibras alimentares aceleram o trânsito do conteúdo intestinal, e por não serem digeridas são fermentadas por bactérias, resultando na formação de ácidos graxos de cadeia curta, que podem agir nas diferentes fases da quimioprevenção, causando apoptose das células cancerosas, ou ativando enzimas metabolizadoras, que podem reduzir a carga de agentes carcinógenos, diminuindo, portanto, o número de mutações, por final, reduzindo o risco de câncer (SCHARLAU *et al.*, 2009). Inúmeras substâncias de origem natural ou sintéticas têm sido avaliadas na quimioprevenção do CCR, dentre elas podemos citar a metformina (TAKAHASHI *et al.*, 2013; HIGURASHI *et al.*, 2012; HOSONO *et al.*, 2010a; HOSONO *et al.*, 2010b).

Para o CCR tem sido proposto o uso de drogas anti-inflamatórias, como inibidoras de ciclooxigenase 2 (COX-2) tanto para prevenção quanto para tratamento adjuvante

(FARJADO & PIAZZA, 2015). Dentre os agentes anti-inflamatórios estudados, está o celecoxibe, um inibidor seletivo de COX-2 utilizado no tratamento de artrite, que demonstrou efeito preventivo sobre o CCR além de ação adjuvante no tratamento de cânceres em estágio avançado. No entanto, esta droga aumenta o risco de doenças cardiovasculares e anemia (CHEN *et al.*, 2014).

A MET, por outro lado, é a droga antihiperlipidêmica mais utilizada no mundo para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (BUZZAI *et al.*, 2007), e os efeitos colaterais principais são distúrbios gastrointestinais (diarréia) e raros casos de acidose lática (HIGURASHI *et al.*, 2012), e raramente induz hipoglicemia (ROJAS & GOMES, 2013). Devido aos raros efeitos colaterais da MET, ela se torna uma droga relativamente segura para a prevenção do CCR (HOSONO *et al.*, 2010b; HIGURASHI *et al.*, 2012).

### 1.5. Metformina

A metformina é uma dimetilbiguanida, descoberta na arruda-caprária (*Galega officinalis*), um arbusto encontrado na Europa e Ásia oriental, que era utilizado como agente antihiperlipidemiante (BAILEY & DAY, 2004). Atualmente, a metformina é uma biguanida produzida de forma semi-sintética, com a adição de dois grupos metil no núcleo de nitrogênio, amplamente utilizada no tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (DEL BARCO *et al.*, 2011) (Figura 3).

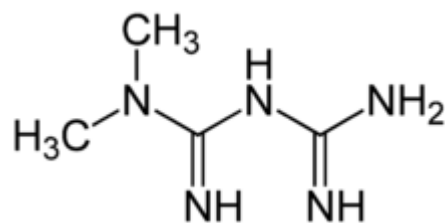


Figura 3 - Fórmula estrutural da metformina (dimetilbiguanida)

Dentre todas as guanidinas, a MET é a mais eficiente (BAILEY, 1992) e começou a ser utilizada de forma isolada em pacientes diabéticos tipo 2 a partir de 1957 (BAILEY, 1992), tornando-se atualmente o agente antihiperlipidemiante de primeira escolha (DAVOREN, 2015).

Seu efeito anti-hiperglicêmico se dá pela inibição da gluconeogênese e da saída de glicose do fígado, que tem como consequência a redução dos níveis de glicose no sangue, diminuindo, portanto, os níveis de insulina (SHAW *et al.*, 2005). Também estimula o

consumo de glicose pelos músculos esqueléticos (ZHOU *et al.*, 2001) e pelos adipócitos (SAHRA *et al.*, 2010). A metformina pode reduzir a resistência à insulina sem afetar a secreção deste hormônio (BAILEY, 1992). Em indivíduos saudáveis, a insulina é produzida pelas células  $\beta$ -pancreáticas, que detectam alterações na concentração de glicose sanguínea e liberam quantidades correspondentes de insulina, capazes de suprir a demanda metabólica (FU *et al.*, 2013). Em indivíduos com DM2, ocorre a deterioração gradativa da função das células  $\beta$ -pancreáticas que gera uma deficiência na secreção de insulina e resistência das células à ação deste hormônio devido à diminuição no número de receptores celulares. Este fenômeno faz com que os tecidos percam a sensibilidade à insulina. Desta forma, numa tentativa compensatória, o pâncreas excede a produção deste hormônio (hipersinsulinemia), gerando um quadro de resistência periférica à insulina (BEARDSALL *et al.*, 2006). Devido ao estado hiperinsulinêmico, o DM2 em si é um fator de risco para o desenvolvimento do CCR (VIGNERI *et al.*, 2009), uma vez que a insulina funciona como fator de crescimento celular, atuando também na diferenciação, adesão, migração e inibição da apoptose, os quais são fatores importantes para a sobrevivência do câncer e metástase (LE ROITH & ROBERTS, 2003; YU & ROHAN, 2000). No caso de indivíduos diabéticos com resistência à insulina, a MET pode agir aumentando a atividade do receptor tirosina-quinase da insulina, aumento da síntese de glicogênio, e aumento no recrutamento e atividade dos transportadores de glicose GLUT4, diminuindo, portanto, a resistência insulínica e o quadro hiperinsulinêmico (GIANNARELLI *et al.*, 2003).

Esta droga vem sendo utilizada em pesquisas para prevenção de vários tipos de câncer, como câncer de mama (GONZALEZ-ANGULO & MERIC-BERNSTAM, 2010), câncer de pulmão (WU *et al.*, 2011), câncer de ovário (RATTAN *et al.*, 2011), e principalmente o câncer colorretal, por ser um tumor insulino-dependente (POLLAK, 2008). HOSONO *et al* (2010b) publicaram a primeira triagem clínica em pacientes não diabéticos na qual a metformina foi capaz de inibir o processo de carcinogênese colorretal em humanos, através de uma dose baixa (250mg/dia) por um mês. Ao se analisar os focos de criptas aberrantes como parâmetro, pôde-se notar que os indivíduos tratados com MET tiveram redução significativa do número destas lesões.

Os mecanismos antitumorais da MET não estão totalmente esclarecidos até o momento. As principais hipóteses de seu mecanismo preventivo se dividem em indireta e direta. Na forma indireta há o envolvimento do seu efeito antidiabético, no qual, ao controlar os níveis de glicose, a MET, por consequência, controla indiretamente os níveis de insulina e a disponibilidade deste hormônio, que é um conhecido fator de crescimento que contribui para

a proliferação das células tumorais (LUENGO *et al.*, 2014). Já na forma direta, sugere-se que a MET exerça um efeito quimiopreventivo direto sobre as células tumorais, independente do seu efeito farmacológico, através da ativação da AMPK (HOSONO *et al.*, 2010a; HIGURASHI *et al.*, 2012).

A via da AMPK (*adenosine-monophosphate-activated protein kinase*) está envolvida com o balanço energético celular, sendo ativada quando há variação na proporção ATP:AMP, na qual o ATP diminui e o AMP aumenta, em condições de menor suprimento energético, ou até mesmo sob condições de estresse celular (KHAN *et al.*, 2005). A MET pode ativar a via AMPK, através da inibição do complexo I da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, diminuindo a respiração oxidativa, que leva a um desequilíbrio energético. Isto faz com que LKB1, um conhecido supressor tumoral, seja a principal quinase capaz de fosforilar e ativar a via AMPK (ANWAR *et al.*, 2014) no fígado e músculos esqueléticos (SHAW *et al.*, 2005; SHACKELFORD & SHAW, 2009).

Quando a via AMPK é ativada, os processos anabólicos são inibidos, enquanto que os processos catabólicos são ativados, mudando os níveis de energia da célula (SAHRA *et al.*, 2010; DEL BARCO *et al.*, 2011). Isto se dá pelo bloqueio de mTOR, o que resulta num bloqueio da divisão celular e da síntese de proteínas (HAN *et al.*, 2006). Por este motivo, é proposto que a MET pode inibir a proliferação de células tumorais (SAHRA *et al.*, 2010).

O estudo da MET como agente preventivo do CCR se faz importante, uma vez que a incidência de indivíduos diabéticos tipo 2 vem aumentando de forma exponencial, com estimativa de 64 milhões de casos até o ano de 2025, somente nas Américas (KING *et al.*, 1998), aumentando, portanto, o consumo desta droga (ROJAS & GOMES, 2013).

A fim de esclarecer se a ação protetora da MET sobre o CCR é dada por uma propriedade quimiopreventiva da droga, sem interferência de suas propriedades antihiperlipidêmicas, mais estudos em modelos não diabéticos se fazem necessários para esclarecer estes mecanismos.

## 2. JUSTIFICATIVA

Devido à alta incidência do câncer colorretal, se fazem necessários estudos que caracterizem agentes quimiopreventivos ou terapêuticos, bem como seus mecanismos de ação. Por este motivo, o presente trabalho avaliou o efeito preventivo da metformina em modelo *in vivo*, de indução de criptas intestinais aberrantes, um evento pré-neoplásico do CCR.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação preventiva da MET no modelo experimental de indução de focos de criptas aberrantes por 1,2-dimetilhidrazina em camundongos fêmeas Balb/c com sete semanas de idade.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Analisar alterações fisiológicas através do peso corpóreo dos animais e de alguns órgãos (coração, pulmões, rins e fígado) no presente modelo experimental;
- Dosar colesterol total, triglicerídeos e glicose no plasma, para identificar se há interferência da ação antihiperlipidêmica da metformina;
- Analisar e quantificar FCA, comparando os resultados entre os segmentos de cólon ascendente, transversal e descendente;
- Verificar a presença de displasia no tecido com criptas aberrantes com coloração para presença de mucina;
- Avaliar o índice mitótico através de coloração com hematoxilina e eosina;
- Avaliar nível de apoptose pelo teste de TUNEL;
- Analisar marcações imunohistoquímicas para p53, iNOS, nitrotirosina, NFkB e Nrf2;
- Avaliar dosagem das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-10 em homogenato do tecido intestinal para análise de resposta pró e anti-inflamatória;
- Verificar o envolvimento do estresse oxidativo no tecido intestinal no efeito protetor da metformina.

#### **4. CONCLUSÕES GERAIS**

No presente estudo, observamos que a metformina, uma droga utilizada como agente antihiperlicemiante no tratamento de diabetes mellitus tipo 2, apresenta potente efeito protetor no modelo de carcinogênese colorrrectal induzida por DMH em animais. No entanto o efeito é observado para protocolo de tratamento simultâneo/contínuo, que simulam o uso da metformina de modo mais contínuo, havendo pouco efeito protetor caso o processo de iniciação já tenha ocorrido (simulado pelo protocolo de pós-tratamento). Além disso, observamos que o efeito quimiopreventivo da MET está relacionado com a modulação do processo inflamatório induzido pela DMH, resultando em menores níveis de estresse oxidativo no tecido intestinal. Desta forma, o presente trabalho, além de reforçar resultados prévios da literatura, a respeito do efeito protetor da MET, aponta um novo mecanismo de ação.

## 5. REFERÊNCIAS

AGARWAL A. & PRABAKARAN S.A. Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, 43:963-974, 2005.

AJOUZ H. *et al.* bile acids: an underrecognized cause of colon câncer. **World Journal of Surgical Oncology**, 12:164, 2014.

ALGIRE C. *et al.* Metformin blocks the stimulative effect of a high-energy diet on colon carcinoma growth *in vivo* and is associated with reduced expression on fatty acid synthase. **Endocrine-related cancer**, 17:351-360, 2010.

ANWAR M.A. *et al.* Colorectal and Prostate Cancer Risk in Diabetes: Metformin, an Actor behind the Scene. **Journal of Cancer**, 5: 736-744, 2014.

ASTON L.M. *et al.* Impact of a reduced red and processed meat dietary pattern on disease risks and greenhouse gas emission in the UK: a modelling study. **BMJ Open**, 2:e001072, 2012.

BAILEY C.J. Biguanides and NIDDM. **Diabetes Care**, 15:755-72, 1992.

BAILEY C.J. & DAY C. Metformin: its botanical background. **Practical Diabetes International**, 21:115–117, 2004.

BEARDSALL, K. *et al.* Applied physiology of glucose control. **Current Paediatrics**, 56:127-156, 2006.

BIANCHI M.L.P & ANTUNES L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, 12:123-130, 1999.

BILLIAR T.R. Nitric Oxide Novel Biology with Clinical Relevance. **Annals of Surgery**, 221, 4:339-349, 1995.

BIRD, R.P. observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, 37:147-151, 1987.

BRUCE W.R. Aberrant crypt foci in the detection of colon carcinogenesis. **Progress in Clinical and Biological Research**, 347:129-137, 1990.

BUZZAI M. *et al.* Systemic Treatment with the Antidiabetic Drug Metformin Selectively Impairs p53-Deficient Tumor Cell Growth. **Cancer Research**, 67:6745-6752, 2007.

CADERNI G. *et al.* Identification of Mucin-depleted Foci in the Unsectioned Colon of Azoxymethanetreated Rats: Correlation with Carcinogenesis. **Cancer Research**, 63:2388–2392, 2003.

CHEN J. *et al.* Efficacy and safety profile of celecoxibe for treating advanced cancers: a meta-analysis of 11 randomized clinical trials. **Clinical Therapeutics**, 36:1253-63, 2014.

COTTI *et al.*, 2000. Genética do câncer colorretal. **Revista de Medicina (São Paulo)**, 79:45-64, 2000.

DAVOREN P. Glucose-lowering medicines for type 2 diabetes. **Australian Family Physician**, 44:176-9, 2015.

De FLORA S. & FERGUSON L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, 591:8-15, 2005.

Del Barco S. *et al.* Metformin: Multi-faceted protection against câncer. **Oncotarget**, 2:896 – 917, 2011.

DIEHL D. *et al.* IGF-II transgenic mice display increased aberrant colon crypt multiplicity and tumor volume after 1, 2-dimethylhydrazine treatment. **Journal of Carcinogenesis**, 5:1-14, 2006.

DURKO L. & MALECKA-PANAS E. Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. **Current Colorectal Cancer Reports**, 10:45–54, 2014.

ESPEY M.G. *et al.* Mechanisms of Cell Death Governed by the Balance between Nitrosative and Oxidative Stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 899:209-21, 2000.

FARJADO A.M. & PIAZZA G.A. Anti-inflammatory approaches for colorectal cancer chemoprevention. **American Journal of Physiology**, 15:59-70, 2015.

FEDERICO A. *et al.* Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, 121:2381–2386, 2007.

FIALA, E.S. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer**, 36:2407-12, 1975.

FU Z. *et al.* Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. **Current Diabetes Review**, 9:25–53, 2013.

GRAB, D.J & ZEDEK, M.S. Organ-specific effects of the carcinogen methylazoxymethanol related to metabolism by nicotinamide adenine dinucleotide-dependent dehydrogenases. **Cancer Research**, 37:4182-9, 1977.

GIAMMARIOLI S. *et al.* Oxidative estress markers: specificity and measurement thecniques. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, 35:567-576, 1999.

GIANNARELLI R. *et al.* Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. **Diabetes & Metabolism**, 29:6S28-35, 2003.

GLOBOCAN, IARC. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)> Acessado em: 17 de julho de 2014.

GONZALES-ANGULO A.M. & MERIC-BERNSTAM F. Metformin: A Therapeutic Opportunity in Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, 16:1695-1700, 2010.

HAN S. *et al.* Fibronectin Stimulates Non-Small Cell Lung Carcinoma Cell Growth through Activation of Akt/Mammalian Target of Rapamycin/S6 Kinase and Inactivation of LKB1/AMP-Activated Protein Kinase Signal Pathways. **Cancer Research**, 66:315-323, 2006.

HIGA R.A. **Estudo da ação antineoplásica do ipê roxo na carcinogênese induzida pelo azoximetano em camundongos.** 2007. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – MS.

HIGURASHI T. *et al.* Metformin efficacy and safety for colorectal polyps: a double-blind randomized controlled trial. **BMC Cancer**, 12:118, 2012.

HOSONO K., *et al.* Metformin Suppresses Azoxymethane-Induced Colorectal Aberrant Crypt Foci by Activating AMP-Activated Protein Kinase. **Molecular Carcinogenesis**, 49:662–671 2010a.

HOSONO K. *et al.* Metformin Suppresses Colorectal Aberrant Crypt Foci in a Short-term Clinical Trial. **Cancer Prevention Research**, 3:1077-1083, 2010b.

HURLEY R.L. *et al.* The  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinases Are AMP-activated Protein Kinase Kinases. **Journal of Biological Chemistry**, 280:29060-29066, 2005.

INDO H. P. *et al.* A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 56:1-7, 2015.

Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2003. Prevenção do Câncer de Intestino. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_49/v04/pdf/norma5.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_49/v04/pdf/norma5.pdf)> Acessado em: 17 de julho de 2014.

Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>> Acessado em: 19 de maio de 2014.

Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2014. <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=319](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319)> Acessado em: 19 de maio de 2014.

JEMAL A. *et al.* Cancer Statistics, 2010. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 60:277–300, 2010.

KELLOFF G.J. *et al.* Cancer Chemoprevention Vol 1: Promising Cancer Chemopreventive Agents. **Humana Press**, 1:697, 2004.

KHAN B.B. *et al.* AMP-activated protein kinase: Ancient energy Review gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metabolism**, 1:15-25, 2005.

KING H. *et al.* Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, 21:1212-1431, 1998.

KNOBEL Y. *et al.* Ferric iron is genotoxic in non-transformed and pre-neoplastic human colon cells. **Food and Chemical Toxicology**, 45:804–11, 2007.

KONDO S. *et al.* Peroxynitrite-mediated stress is associated with proliferation of human metastatic colorectal carcinoma in the liver. **Cancer Letters**, 179:87–93, 2002.

KYUNG-SOO *et al.* Chemoprevention of Gastrointestinal Cancer: The reality and the dream. **Gut and Liver**, 7:137-149, 2013.

LALAND K.N. *et al.* How culture shaped the human genome: bringing genetics and the human sciences together. **Nature Reviews Genetics**, 11:137-148, 2010.

LAMONT, J.T. & O'GORMAN, T.A. Experimental colon cancer. **Gastroenterology**, 75:1157-69, 1978.

LAQUEUR G.L. Carcinogenic effects of cycad meal and cycasin, methylazoxymethanol glycoside, in rats and effects of cycasin in germfree rats. **Federation Proceedings**, 23:1386-1388, 1964.

LE ROITH D. & ROBERTS C.T. Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. **Cancer Letters**, 195:127-37, 2003.

LUENGO A. *et al.* Understanding the complex-ity of metformin action: limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. **BMC Biology**, 12:82, 2014.

MALLMANN A.C.M. *et al.* Rastreamento do câncer colorretal. **Momento & Perspectivas em Saúde - Porto Alegre**, 16:13-15, 2003.

McLELLAN E.A. *et al.* Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. **Cancer Research**, 51:5270-5274, 1991.

MIRVISH S.S. *et al.* N-nitroso compounds and their precursors in hot dog and in the gastrointestinal tract and feces of rats and mice: possible etiologic agents for colon cancer. **Journal of Nutrition**, 132:3526S-3529S, 2002.

NAGASAWA, H.T. *et al.* Decomposition of methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin in H<sub>2</sub>O. **Nature**, 236:234-5, 1972.

OLIVEIRA A.L. & AARESTRUP F.M. Nutritional status and systemic inflammatory activity of colorectal patients on symbiotic supplementation. **ABCD - Arquivos Brasileiros De Cirurgia Digestiva**, 25:147-153, 2012.

OLIVEIRA, Mariana Brait R., BUSTOS, Silvina Odete, DELLAMANO, Marcia. Carcinógenos químicos e físicos. In: LOPES, Ademar, CHAMMAS, Roger, IYEYASU, Hirofumi. **Oncologia para a Graduação**. 3<sup>o</sup> edição. Local: São Paulo: Lemar, 2013. p.54-61.

OSHIMA H. *et al.* Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 417:3-11, 2003.

PEREIRA M.A. & KHOURY M.D. Prevention by chemopreventive agents of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon. **Cancer Letters**, 61:27-33, 1991.

PÉREZ CUETO F.J.A. Prevención del câncer colorrectal con dieta y actividad física: actualización reciente. **Nutrición Hospitalaria**, 26:1491, 2011.

PERICLEOUS M. *et al.* Diet and supplements and their impact on colorectal câncer. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, 4:409-423, 2013.

PINHO M.S.L. Biologia Molecular do Câncer Colorretal: Uma Revolução Silenciosa em Andamento. **Rev bras Coloproct.**, 28: 353-368, 2008.

PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, 72:962-7, 1993.

PITOT, H.C. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. **Japanese Journal Of Cancer Research**, 80:599-607, 1989.

POLLAK M. Insulin and insulin-like growth factor signaling in neoplasia. **Nature Reviews Cancer**, 8:915-28, 2008.

PRYOR W.A. & GODBER S.S. Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, 10:177-184, 1991.

RATTAN R. *et al.* Metformin Suppresses Ovarian Cancer Growth and Metastasis with Enhancement of Cisplatin Cytotoxicity In Vivo. **Neoplasia**, 13:483-91, 2011.

ROJAS L.B.A. & GOMES M.B. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 5:6, 2013.

ROLÃO A. *et al.* Qual o perfil nutricional e de estilos de vida do doente oncológico? **Acta Médica Portuguesa**, 24:113-122, 2011.

ROSENBERG D.W. *et al.* Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 30:183–196, 2009.

RUBINFELD B. *et al.* Loss of beta-catenin regulacion by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. **Cancer Research**, 57:4624-30, 1997.

RUDOLPH, R.E. *et al.* Risk factors for colorectal cancer in relation to number and size of aberrant crypt foci in humans. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 14:605-8, 2005.

RUGGERI B.A. *et al.* Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. **Biochemical Pharmacology**, 87:150–161, 2014.

SAHRA I.B. *et al.* Metformin in Cancer Therapy: A New Perspective for an Old Antidiabetic Drug? **Molecular Cancer Therapeutics**, 9:1092-9, 2010.

SHACKELFORD D.B. & SHAW R.J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumor suppression. **Nature Reviews Cancer**, 9:563–575, 2009.

SCHARLAU D. *et al.* Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. **Mutation Research**, 682:39–53, 2009.

SHAW R.J. *et al.* Kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. **Science**, 310:1642–1646, 2005.

SILVA, L.A.G. **Criptas aberrantes como biomarcador da oncogenese do cólon: análise comparativa entre testes de curta e média duração em modelo de carcinogênese pela DMH no rato.** 95p. Dissertação de mestrado- Faculdade de Medicina- UNESP- Botucatu- São Paulo- Brasil, 1999.

SILVA M.P.N. Síndrome da Anorexia – caquexia em portadores de câncer. **Rev. Bras. Canc.**, 521:59-77, 2006.

STEVENS, R.G. *et al.* Epidemiology of colonic aberrant crypt foci: Review and analysis of existing studies. **Cancer Letters**, 252:171–183, 2006.

STEWART W.P. & BROWN K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. **British Journal of Cancer**, 109:1–7, 2013.

SURH Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, 3:768-80, 2003.

SWENBERG J.A. *et al.* 1,2-Dimethylhydrazine-induced methylation of DNA bases in various rat organs and the effect of pretreatment with disulfiram. **Cancer Research**, 39:465-466, 1979.

TAKAHASHI H. *et al.* Colon epithelial proliferation and carcinogenesis in diet-induced obesity. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 28:41–47, 2013.

TAKAHASHI M. & WAKABAYASHI K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer Science**, 95:475-480, 2004.

TOTH B. Synthetic and Naturally Occurring Hydrazines as Possible Cancer Causative Agents. **Cancer Research**, 35:3693-3697, 1975.

TOTH, Bela. **Hydrazines, related chemicals and hydrazine-containing natural products.** In:\_\_\_\_\_. Hydrazines and Cancer. 1° edição. Amsterdã: Harwood academic publishers, 2005. 335.

VALADÃO M. & CASTRO L.S. Câncer colo-retal hereditário. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, 34:3, 2007.

VALKO M. *et al.* Radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, 160:1–40, 2006.

VIGNERI P. *et al.* Diabetes and cancer. **Endocrine-Related Cancer**, 16:1103-1123, 2009.

VIVONA A.A. *et al.* K-ras mutation in the aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 14:1777-1781, 1993.

VOLGESTEIN B. & FEARON E.R. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, vol 61:759-767, 1990.

YOSHIDA M. *et al.* Evaluation of Nutritional Availability and Anti-Tumor Activity of Selenium Contained in Selenium-Enriched *Kaiware* Radish Sprouts. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 71:2198-2205, 2007.

YU H. & ROHAN T. Role of the Insulin-Like Growth Factor Family in Cancer Development and Progression. **Journal of the National Cancer Institute**, 92:1472-89, 2000.

WORLD CANCER RESEARCH FOUND. Disponível em :  
<[http://www.wcrf.org/cancer\\_statistics/world\\_cancer\\_statistics.php](http://www.wcrf.org/cancer_statistics/world_cancer_statistics.php)> Acessado em : 10 de junho de 2014.

WU N. *et al.* Metformin induces apoptosis of lung cancer cells through activating JNK/p53 MAPK pathway and GADD153. **Neoplasma**, 58:482-90, 2011.

ZHOU G. *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **Journal of Clinical Investigation**, 108:1167–1174, 2001.

**ANEXOS**

**ANEXO A**

Artigo:

**Protective effect of metformin in an aberrant crypt foci model induced by 1,2-dimethylhydrazine: Modulation of oxidative stress and inflammatory process**

Revista:

**Molecular Carcinogenesis**

Normas da revista disponíveis no link:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-2744/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2744/homepage/ForAuthors.html)

**Protective effect of metformin in an aberrant crypt foci model induced by 1,2-dimethylhydrazine: Modulation of oxidative stress and inflammatory process**

Heloiza Paranzini Bordini<sup>1</sup>, Jean Lucas Kremer<sup>1</sup>, Tatiane Renata Fagundes<sup>1</sup>, Gabriella Pasqual Melo<sup>2</sup>, Ivete Conchon Costa<sup>3</sup>, Suelen Santos Da Silva<sup>3</sup>, Rubens Cecchini<sup>2</sup>, Carolina Panis<sup>4</sup>, Rodrigo Cabral Luiz<sup>1</sup>.

*1 Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Brazil.*

*2 Laboratory of Pathophysiology of Free Radicals, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Brazil.*

*3 Laboratoty of Parasitology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Brazil.*

*4 Laboratory of Inflammatory Mediators, Center of Healthy Sciences, West of Parana State University, Francisco Beltrão, Brazil.*

Colorectal Cancer (CRC) is the third most frequent cancer in the world. In the last few years, studies have revealed a protective effect of metformin (MET - an anti hyperglycemic drug, used in the treatment of type 2 diabetes), against CRC. The protective effect of MET has been associated with AMPK activation (and mTOR inhibition), resulting in suppressed protein synthesis, and reduced cell proliferation in malignant transformed cells. To elucidate new mechanisms for the protective effect of metformin, we evaluated the modulation of oxidative stress and inflammatory process, once these processes are strictly involved in colorectal carcinogenesis. The present study evaluated the protective effect of MET in a CRC model induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in Balb/c female mice. The simultaneous/continous treatment (administration of MET and DMH simultaneously), revealed protective activity of MET, preventing the formation of aberrant crypt foci (ACF) in 71.4% at distal colon sections, and was able to restore basal levels of apoptosis, and prevent dysplastic associated events. MET treatment also reduced inflammatory process induced by DMH, resulting in lower levels of oxidative stress and nitric oxide related molecules.

**Key words:** Colorectal cancer, metformin, 1,2-dimethylhydrazine, aberrant crypt foci, prevention.

**Corresponding author:** Rodrigo Cabral Luiz

Rod. Celso Garcial Cid, PR445, Km 380, Campus universitário. Londrina-PR, CEP 86051-990, Brasil. Phone +55 (43) 3371-4529. Fax +55 (43) 3371-4267. rc.luiz@uel.br

## INTRODUCTION

Colorrectal cancer (CCR) is the third most frequent cancer in the world, mostly in developed countries [1]. The high incidence of CCR is related to bad eating habits, smoking, alcoholism, sedentary lifestyle and obesity [2-4]. In the last few decades the use of agents capable to block or delay the carcinogenic process have been proposed as a preventive strategy against CCR [5,6]. Promising agents against CRC are COX-2 inhibitors, but due to its serious cardiovascular side effects [7], safer drugs need to be studied.

In the last few years, metformin, a dimethylbiguanide, used in treatment of type 2 diabetes, has shown preventive effect against CCR in clinical trials and experimental approaches [8-10]. Up to date, there are two main mechanisms proposed: (i) inhibition mTOR by AMPK activation, resulting in the reduction of protein synthesis and cell proliferation; (ii) and the antidiabetic effects of metformin, that would reduce insulin levels, a growth factor to cancer cells [9,11]. To elucidate other mechanisms involved in metformin preventive effect, the present study evaluated the involvement of metformin-mediated oxidative stress modulation, in an 1,2-dimethylhydrazine-induced CRC model.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and animals

Seven-week female Balb/c mice were purchased from the Center of Biological Sciences from State University of Londrina (UEL). Six mice were housed per cage, with sterilized food (basal diet Nuvilab®), water and softwood chips used as bedding. Mice were treated according to national resolutions, and the experiment was approved by the Committee of Ethics in the Use of Animals (CEUA-UEL). To induce colorrectal cancer, 1,2-dimethylhydrazine (DMH) was purchased from Sigma (St. Louis, USA). Metformin (Sigma) was dissolved in drinking water at a dose of 50mg/Kg, replaced daily [12].

### Weighing of animals and organs

Animals were weighted in the first day of treatment and at the day of sacrifice. In the moment of sacrifice, heart, lungs, kidneys and liver were removed and weighted.

### Plasma biochemical markers

Blood was collected from heart puncture in the moment of sacrifice and centrifugated to obtain plasma. Biochemical levels were measured according to manufacturer's protocol (Cholesterol - Doles; Triglycerides and Glucose – Vida biotecnologia).

### Induction of Aberrant Crypt Foci

Animais were divided in five groups: a control group drinking normal water (group 1), a group with metformin added in the water (group 2), a positive control that received four intraperitoneal injections of DMH, twice a week for two weeks with 20mg/Kg (group 3), and two associated groups that received metformin all the time or just after the injections of DMH (group 4 and group 5, respectively). Eight weeks after the last DMH application, animais were sacrificed (Figure 1).

### Aberrant Crypt Foci and Crypt Foci analysis

At the moment of sacrifice, the large intestine was removed and washed with saline 0.9% to remove fecal contents, opened longitudinally, and fixed flat in styrofoam in 10% buffered formalin for 24h. After fixation, intestines were washed and stained with 0.1% methylene blue, and were microscopically observed. Intestines were divided in three equal sections (proximal, medial and distal), and it was quantified the number of ACF and its multiplicity in each section. ACF were identified according to Bird [13].

### Analysis for mucin presence

Combined alcian blue – PAS technique was used to analyse acid and neutral mucin depletion, as an indicator of dysplasia.

### Mitotic Index

Segments of intestine were embedded in paraffin and cut in 5µm tissue sections (microtome SLEE), and stained with hematoxilin and eosin (H&E) [14]. The slides were observed in optic microscope, accounting the number of mitotic cells per field. Crypts were divided in two equal portions: low crypt position (closer to basal membrane) and high crypt position (closer to the intestinal lumen). The presence of aberrant mitotic figures was also evaluated.

### Apoptosis assay

Intestines were embedded in paraffin and cut in 5µm tissue sections (microtome SLEE). The apoptotic tumor cells were stained using a TUNEL staining kit according to the manufacturer's instruction (Dead-End™ Colorimetric TUNEL system, Promega). Cells showing positive staining (dark brown) for TUNEL were counted in each crypt per field [9].

### Immunohistochemistry

Each segment of intestine embedded in paraffin was cut in 5µm tissue sections longitudinally (microtome SLEE). The slides were deparaffinized and blocked for endogenous peroxidase with 1% hydrogen peroxide for 20 minutes, followed by immersion in FBS 1% for 30 minutes. Specific antibodies were used for detection of p53 (FL-393), phosphorylated NFκB-p65 (A), Nrf2 (C-20), inducible NO synthase (iNOS) (N-20) and nitrotyrosine (HM11) (Santa Cruz Biotechnology). The antibodies were applied over night in humid medium under refrigeration. Then, a secondary antibody was applied on the slides for 1 hour. Diaminobenzidine (DAB) was used as chromogen for 1 minute at room temperature (Santa Cruz Biotechnology). Slides were counterstained with Harris hematoxylin, and coverslipped. Slides were visualized in a photomicroscope (Olympus BX43), and the photomicrographs were analysed at ImageJ.

### Cytokine measurement

Samples of the intestine were homogenized in 500 µL of buffer containing protease inhibitors, and IL-1β and IL-10 levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions (eBioscience®, USA), using an ELISA plate reader (Thermo Plate—TP-Reader) at 450nm. Results were expressed in pg cytokine/mg of tissue [15].

### Involvement of oxidative stress

Intestine samples were homogenized in an Ultraturrax homogenizer containing 25mg of tissue/ml (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KCl buffer) for malondialdehyde (MDA) measure, and 0.5mg of tissue/ml (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2mM degassed buffer) for nitric oxide (NO) measure. MDA levels were determined according to Jentsch et al [16], in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1650 PC) in 535nm and 572nm and the results were expressed in nmol/25mg tissue. To the NO analysis, a

chemiluminescence realtime (Glomax 20/20 Luminometer) was performed according Terra et al [17]. Results were expressed in RLU/g of tissue (relative light units).

#### Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis were performed using the One way ANOVA followed by t-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Effect of metformin on weight measurements and biochemical markers

We did not observe significant difference in the inicial and final body weights among all groups (Table 1). The organs weights were also not affected (Table 2). There was no significant alteration in any of the biochemical markers tested (Table 3).

### Effects of metformin in ACF model

Metformin (group 2) showed no capacity to induce ACF/mice or AC/mice, but Metformin (group 4) was able to significantly inhibit ACF/mice (47.4% reduction) and AC/mice (58.3% reduction) induced by DMH treatment. On the other hand, Metformin (group 5) showed no preventive capacity (Table 4).

Considering the intestine segments, DMH induced AC predominantly at the proximal portion of the intestine. Compared to DMH (group 3), Metformin (group 4) significantly reduced the number of ACF and AC in proximal and distal sections, with predominant preventive effect in distal sections. Once more, Metformin (group 5) showed no preventive effect, and was discontinued in the present study (Figure 2A).

In our experimental conditions we did not observe the depletion of mucin in any of the treatment groups, revealing the absence of dysplastic crypts (Figure 2B).

In Control (group 1), and Metformin treatment (groups 2 and 4), was observed the presence of mitotic figures in the low crypt position. DMH treatment (group 3) increased the number of mitotic figures in the low crypt position and induced the presence of mitotic figures in the high crypt position. Metformin (group 4) significantly reduced the number of mitotic figures compared to DMH (group 3) (Figure 3).

### Effect of metformin on apoptosis and p53

Metformin (group 2) presented apoptotic rate similar to control (group 1). The treatment with DMH (group 3) significantly reduced apoptotic rate. Animals treated with Metformin (group 4), presented increased apoptotic rate compared to DMH (group 3) (Figure 4A).

Immunohistochemistry for p53 revealed that Metformin (group 2) was able to increase p53 level in comparison to control (group 1). On the other hand, DMH (group 3) showed significantly reduced levels of p53, which were restored in Metformin (group 4) (Figure 4B).

### Metformin in Oxidative Stress and Inflammation

Intestine of animals from control (group 1) and Metformin (group 2) presented similar levels of NFkB, whereas DMH (group 3) showed significantly increased levels. Treatment with Metformin (group 4) was able to restore NFkB labeling to control levels (Figure 5A).

Metformin (group 2) showed increased levels of Nrf2 compared to control (group 1), while DMH (group 3) presented important increased levels, and the treatment with Metformin (group 4) had decreased levels of Nrf2 compared to DMH (group 3) (Figure 5B).

By calculating the ratio between NFkB and Nrf2, we obtained the oxidative stress index, which showed that treatment with Metformin (groups 2 and 4) is capable of reducing the oxidative stress induced by DMH (group 3) (Figure 5C).

MDA results showed that Metformin (group 2) presented reduced levels compared to control (group 1), and also did the DMH (group 3). On the other hand, Metformin (group 4) was able to restore MDA levels compared to control group (Figure 5D).

NO levels did not vary significantly between control (group 1) and Metformin (group 2). DMH (group 3), by contrast, had significantly higher levels of NO, and the treatment with Metformin (group 4), reduced NO levels significantly (Figure 6A).

For iNOS labeling, control (group 1) and Metformin (group 2) were statistically equivalents, while DMH (group 3) showed increased levels of iNOS. Treatment with Metformin (group 4) was able to reduce iNOS levels and became similar to control (group 1) (Figure 6B).

Following these results, nitrotyrosine labeling showed that Metformin (group 2) had very similar levels compared to control (group 1), and DMH showed significantly increased levels of nitrotyrosin, while Metformin (group 4) decreased nitrotyrosine labeling (Figure 6C).

For IL-1 $\beta$ , control (group 1) and Metformin (group 2) had similar levels, but DMH (group 3) showed significantly higher levels, and treatment with Metformin (group 4) reduced IL-1 $\beta$  levels (Figure 7A). For IL-10, Metformin (group 2) had similar levels to control (group 1),

DMH (group 3) showed markedly reduction of IL-10, and treatment with Metformin (group 4) was able to increase IL-10 levels in the intestinal tissue (Figure 7B).

The ratio between IL-1 $\beta$  and IL-10 showed that treatment with Metformin (group 2) did not modify intestinal immunity. Treatment with DMH (group 3) produced a pro-inflammatory status that was modulated by Metformin treatment (group 4) (Figure 7C).

## DISCUSSION

In the present study we showed that metformin is capable of preventing the development of pre-cancerous lesions in the large intestine of animals, induced by DMH.

In humans, the distal colon is the portion of the intestine with major incidence of ACF [18]. In the present work, Metformin (group 4) decreased the development of pre-cancerous lesions mostly in the distal portion of the intestine, revealing a promising result that has not been described so far.

Alcian blue and PAS revealed the absence of dysplastic ACF with mucin depletion in all groups, which is an important parameter to distinguish hyperplastic and dysplastic crypts [19]. In DMH treatment we observed the presence of mitotic figures at the high portion of the crypt, indicating a dysregulation in the intestine proliferation/apoptosis balance [20], which is confirmed by lower apoptotic rate. We also observed presence of atypical mitotic figures, which may contribute to neoplasia development. Treatment with Metformin (group 4) was able to prevent changes in mitosis location and the appearance of atypical figures, reducing the possibility of neoplastic transformation.

To determine indirect effect of metformin, we measured serum biochemical markers as cholesterol, triglycerides and glucose, and Metformin treatments did not modify these parameters, indicating that the preventive effect may not be related to antidiabetic properties [9].

It is expected that the large intestine has a considerable level of apoptosis at the high portion of the crypt, since it is a labile tissue [20]. Our findings reveal that DMH treatment reduces apoptosis rate. Previously, Saini & Sanyal [21] also observed the reduction of apoptosis percentage in animals treated with DMH, with markedly increased expression of PI3-K and Akt signaling proteins. On the other hand, metformin exhibited potential to restore the apoptotic levels in the intestine.

Treatment with Metformin (group 2) showed an increase in p53 labeling, without affecting apoptotic rate. A possible explanation is that p53 blocks cell cycle and induces apoptosis only in damaged cells [22]. For DMH treatment we observed reduced p53 levels associated with

lower apoptotic rate, allowing DNA-damaged cells to proliferate, resulting in ACF generation [23]. Metformin (group 4) increased the levels of p53, enabling damaged cells to undergo apoptosis, what partially explains its protective effect.

In our study, Metformin (group 2) presented significantly lower levels of MDA, suggesting that this drug interferes on oxidative stress. Metformin can act as an antioxidant molecule, by directly scavenging ROS [24-25]. In DMH (group 3), we also observed decreased levels of MDA that can be explained by the increased levels of Nrf2 labeling, revealing that the tissue is responding to oxidative stress. Nrf2, is an important transcription factor that regulates the expression of enzymes able to protect the cells from injuries [26]. Animals treated with metformin (group 2) had increased Nrf2 labeling, as observed by other authors in other experimental models [27-28], and shows that indirect antioxidant effect of metformin depends on Nrf2 signaling.

NFkB is a transcription factor induced by a variety of immunity mediators involved in inflammation, and can also be activated in oxidizing conditions [29]. Our results showed that DMH treatment increased NFkB labeling, confirming the presence of oxidative stress and inflammation. The oxidative stress index showed that metformin (group 4) protected the intestine against DMH-induced oxidative stress, suggesting that oxidative stress modulation is an important mechanism of metformin against CRC carcinogenesis.

In our experimental model metformin did not affect NO levels, iNOS expression or nitrotyrosine labeling. Treatment with DMH increased all NO-related parameters. This result is in agreement with other studies, such as increased iNOS expression in AOM-induced rat colon tumours [30], and increased nitrotyrosine levels in human colon carcinoma [31,32]. Taken together, these results confirm the importance of nitrosative stress in colorectal carcinogenesis [31]. Treatment with metformin (group 4), reversed all NO-related parameters to control levels, showing that modulation of nitrosative stress is also involved in the protective effect of metformin.

To investigate the involvement of inflammatory process, we measured IL-1 $\beta$  and IL-10. Our results showed that treatment with DMH induced inflammatory process in intestinal tissue [33], and that treatment with metformin (group 4) was able to modulate the inflammatory process by increasing IL-10 levels and inhibition of NFkB signals, suppressing a subsequent inflammatory process, as proposed by Hirsch et al [34].

In conclusion, our study confirmed that metformin exerts a protective effect on colorectal cancer, specially in protocol simultaneous/continuous. For the first time, we showed that

metformin exerts its protective effect by many mechanisms, including oxidative and nitrosative stress, and inflammatory process modulation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thanks CAPES for financial support.

#### REFERENCES

1. WCRF - World Cancer Research Found. Disponível em : <[http://www.wcrf.org/cancer\\_statistics/world\\_cancer\\_statistics.php](http://www.wcrf.org/cancer_statistics/world_cancer_statistics.php)>
2. Oliveira AL, Aarestrup FM. Nutritional status and systemic inflammatory activity of colorectal patients on symbiotic supplementation. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2012;25(3):147-153.
3. Pérez Cueto FJA. Prevención del câncer colorrectal con dieta y actividad física: actualización reciente. *Nutr Hosp* 2011;26(6):1491.
4. Rolão A, Monteiro-Grillo I, Camilo ME, Ravasco P. Qual o perfil nutricional e de estilos de vida do doente oncológico? *Acta Med Port* 2011;24:113-122.
5. Kelloff GJ, Kawk ET, Sigman CC. *Cancer Chemoprevention: Promising Cancer Chemopreventive Agents*. Humana Press 2004;1:697.
6. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev. Cancer* 2003;768 – 780.
7. Chen J, Shen P, Zhang XC, Zhao MD, Zhang XG, Yang L. Efficacy and safety profile of celecoxibe for treating advanced cancers: a meta-analysis of 11 randomized clinical trials. *Clin Ther* 2014;36:1253-63.
8. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005;330:1304.
9. Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al. Metformin Suppresses Azoxymethane-Induced Colorectal Aberrant Crypt Foci by Activating AMP-Activated Protein Kinase. *Molecular Carcinogenesis* 2010;49:662–671.
10. Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al. Metformin Suppresses Colorectal Aberrant Crypt Foci in a Short-term Clinical Trial. *Cancer Prev Rev* 2010;3:1077-1083.
11. Luengo A, Sullivan LB, Heiden MG. Understanding the complex-I-ty of metformin action: limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. *BMC Biology*, 12:82, 2014.

12. Algire C, Amrein L, Zakikhani M, Panasci L, Pollak M. Metformin blocks the stimulative effect of a high-energy diet on colon carcinoma growth in vivo and is associated with reduced expression on fatty acid synthase. *Endocrine-related Cancer* 2010;17: 351-360.
13. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Letters* 1987;37:147-151.
14. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining for tissue and cell sections. *CSH Protoc* 2008.
15. Ivan ALM, Campanini MZ, Martinez RM, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2014, 138:124-133.
16. Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:251-256.
17. Terra VA, Souza-Neto FP, Pereira RC, et al. Nitric oxide is responsible for oxidative skin injury and modulation of cell proliferation after 24 hours of UVB exposures. *Free Radical Res* 2012;46:872-882.
18. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. Aberrant Crypt Foci: A Review *Toxicol Pathol* 1999;27:632.
19. Caderni G, Femia AP, Giannini A, et al. Identification of Mucin-depleted Foci in the Unsectioned Colon of Azoxymethanetreated Rats: Correlation with Carcinogenesis. *Cancer Research* 2003;63: 2388–2392.
20. Kozoni V, Tsioulis G, Shiff S, Rigas B. The effect of lithocholic acid and apoptosis during the early stages of colon carcinogenesis: differential effect on apoptosis in the presence of a colon carcinogen. *Carcinogenesis* 2000;21:999-1005.
21. Saini MK, Sanyal SN. PTEN regulates apoptotic cell death through PI3K/Akt/GSK3B signaling pathway in DMH induced early colon carcinogenesis in rat. *Exp Mol Pathol* 2012;93:135-146.
22. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, et al. Activation of AMP-activated Protein Kinase Induces p53-dependent Apoptotic Cell Death in Response to Energetic Stress. *The Journal of Biological Chemistry* 2008;283:3979–3987.
23. Umesalma S, Nagendraprabhu P, Sudhandiran G, et al. Antiproliferative and apoptotic-inducing potential of ellagic acid against 1,2-dimethyl hydrazine-induced colon tumorigenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem* 2014;388:157–172.

24. Bonnefont-Russello D, Raji B, Walrand S, et al. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism* 2003;52:586-9.
25. Faure P, Wiernsperger N, Polge C, Favier A, Halimi S. Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin. *Clinical Science* 2008;114:251-256.
26. Li W, Khor TO, Xu C, et al. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1485-1489.
27. Yang S, Ji L, Que L, Wang K, Yu S. Metformin activates Nrf2 signaling and induces the expression of antioxidant genes in skeletal muscle and C2C12 myoblasts. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 2014;23:837-843.
28. Ashabi G, Khalaj L, Khodaghali F, Goudarzvand M, Sarkaki A. Pre-treatment with metformin activates Nrf2 antioxidant pathways and inhibits inflammatory responses through induction of AMPK after transient global cerebral ischemia. *Metab Bran Dis* 2015;30:747-754.
29. Bellezza I, Mierla AL, Minelli A. Nrf2 and NFkB and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression. *Cancers* 2010;2:483-479.
30. Takahashi M, Fukuda K, Ohata T, Sugimura T, Wakabayashi K. Increased Expression of Inducible and Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthases in Rat Colon Tumors Induced by Azoxy methane. *Cancer Research* 1997;57:1233-1237.
31. Gochman E, Mahajna J, Shenzer P, et al. The expression of iNOS and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans. *Acta Histochemica* 2012;114:827-835.
32. Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *Journal of Surgical Oncology* 1999;70:222-229.
33. Tanaka T, Yasui Y, Tanaka M, Tanaka T, Oyama T, Rahman KM. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. *Chemico-Biological Interactions* 2009;177:128-136.
34. Hirsch H, Iliopoulos D, Struhl K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *PNAS* 2013;110:972-977.

**TABLES**

Table 1 – Inicial and final body weight of the animals

<b>Treatment</b>	<b>Inicial body weight (g/mice)</b>	<b>Final body weight (g/mice)</b>
Control (group 1)	15,76 ± 0,95	18,33 ± 0,42
Metformin (group 2)	15,83 ± 0,30	18,33 ± 0,42
DMH (group 3)	15,83 ± 0,74	18,83 ± 0,60
Metformin (group 4)	17,00 ± 1,37	17,40 ± 0,87
Metformin (group 5)	16,83 ± 0,47	17,83 ± 0,40

The body weight of the animals (mean±SD) were measured at the first day of treatment and at the day of sacrifice. No significant difference was observed among the groups.

Table 2 – Weight of the organs

	<b>Heart (g/mice)</b>	<b>Lungs (g/mice)</b>	<b>Kidneys (g/mice)</b>	<b>Liver (g/mice)</b>
Control (group 1)	0.109 ± 0.005	0.193 ± 0.011	0.277 ± 0.009	0.824 ± 0.002
Metformin (group 2)	0.108 ± 0.002	0.156 ± 0.006	0.276 ± 0.007	0.732 ± 0.093
DMH (group 3)	0.097 ± 0.004	0.170 ± 0.007	0.281 ± 0.008	0.760 ± 0.062
Metformin (group 4)	0.092 ± 0.002	0.160 ± 0.008	0.257 ± 0.011	0.708 ± 0.089
Metformin (group 5)	0.080 ± 0.014	0.181 ± 0.011	0.273 ± 0.004	0.732 ± 0.014

Weight of the organs (mean±SD) after sacrifice. No significant difference was observed among the groups.

Table 3 – Biochemical markers in the plasma

	<b>Total Cholesterol (mg/dL)</b>	<b>Triglycerides (mg/dL)</b>	<b>Glucose (mg/dL)</b>
Control (group 1)	106.25 ± 9.82	63.25 ± 15.9	84.56 ± 16.94
Metformin (group 2)	96.16 ± 51.47	106.06 ± 42.53	91.7 ± 7.59
DMH (group 3)	100.06 ± 36.42	61.72 ± 12.78	105.75 ± 6.65
Metformin (group 4)	94.12 ± 25.12	168.22 ± 145.73	100.13 ± 4.49
Metformin (group 5)	111.5 ± 29.53	393.75 ± 463.59	81.41 ± 15.82

Data are expressed as mean±SD. No significant difference was observed among the groups.

Table 4 – Number of ACF/mice and percentage of damage reduction

<b>Treatment</b>	<b>No. of mice</b>	<b>No. of ACF/mice<sup>a</sup></b> Percentage of reduction	<b>No. of AC/mice<sup>a</sup></b> Percentage of reduction
Control (group 1)	6	0 ± 0 --	0 ± 0 --
Metformin (group 2)	6	0 ± 0 --	0 ± 0 --
DMH (group 3)	6	7.6 ± 1.2 <sup>a</sup> --	16.8 ± 2.7 <sup>a</sup> --
Metformin (group 4)	5	4.0 ± 0.3 <sup>a,b</sup> 47.4%	7.0 ± 0.8 <sup>a,b</sup> 58.3%
Metformin (group 5)	6	9.0 ± 1.7 <sup>a</sup> -18.4%	17.2 ± 2.7 <sup>a</sup> -2.4%

ACF = aberrant crypt foci, AC = aberrant foci. <sup>a</sup> significant difference compared to control (group 1), p<0.05; <sup>b</sup> indicates difference from DMH (group 3), p<0.05.

Figure 1

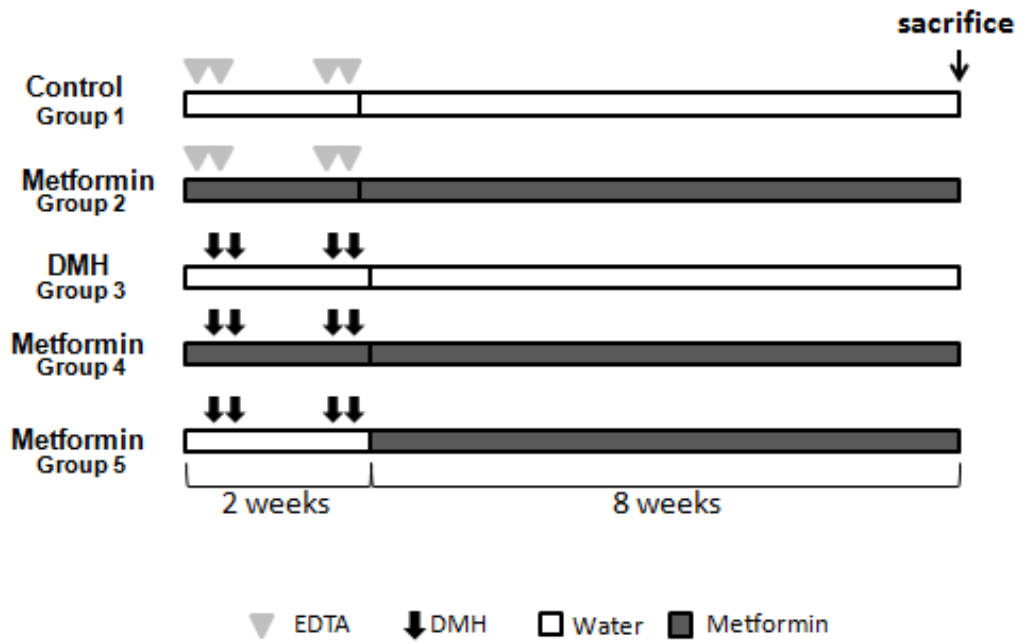


Figure 2

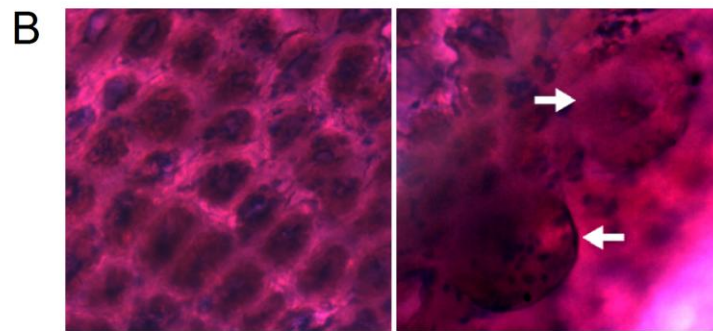
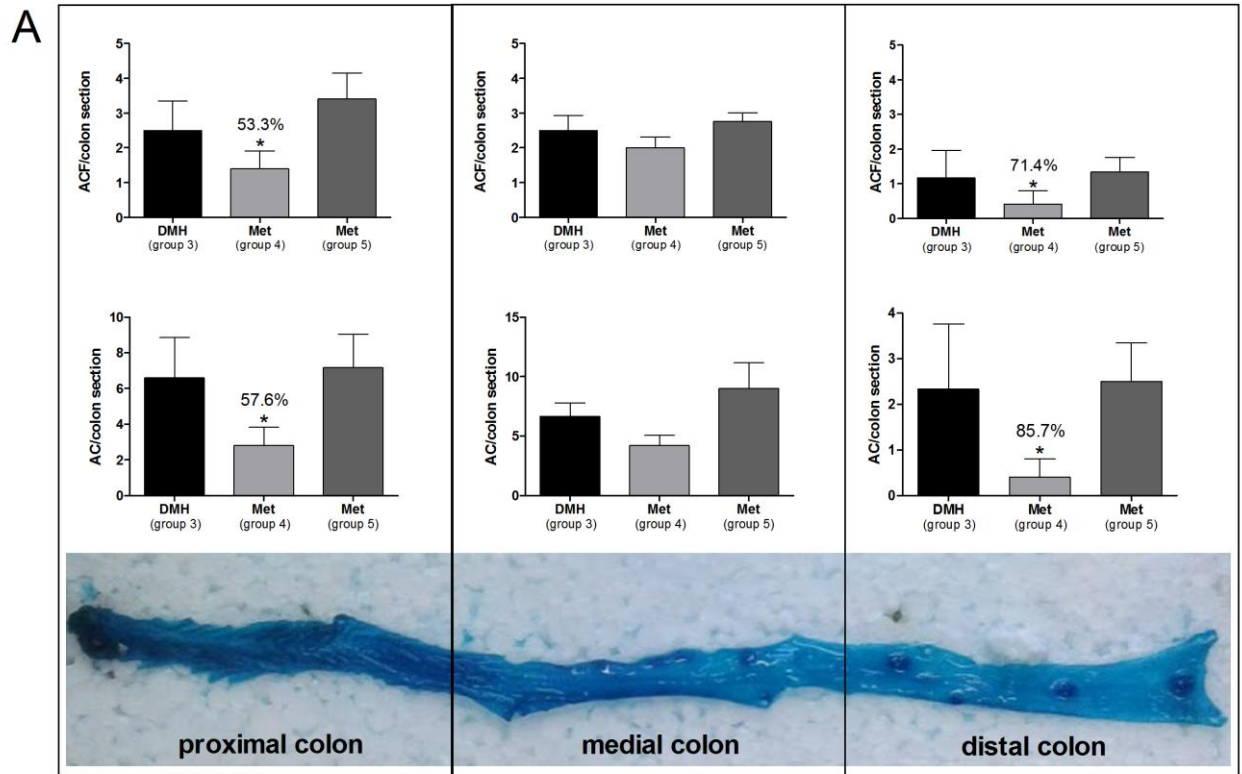


Figure 3

A Number of mitotic figures in 10 high-power fields (400x).

	High crypt position	Low crypt position	Total	Abnormal mitotic figures
Control (group 1)	0	3.25±1.25	1.63±1.92	-
Metformin (group 2)	0	3.5±1.29	1.75±2.05	-
DMH (group 3)	1.25±0.95 <sup>a</sup>	5±1.4 <sup>a</sup>	3.1±2.3 <sup>a</sup>	+
Metformin (group 4)	0	3.25±1.5 <sup>b</sup>	1.75±1.91 <sup>b</sup>	-

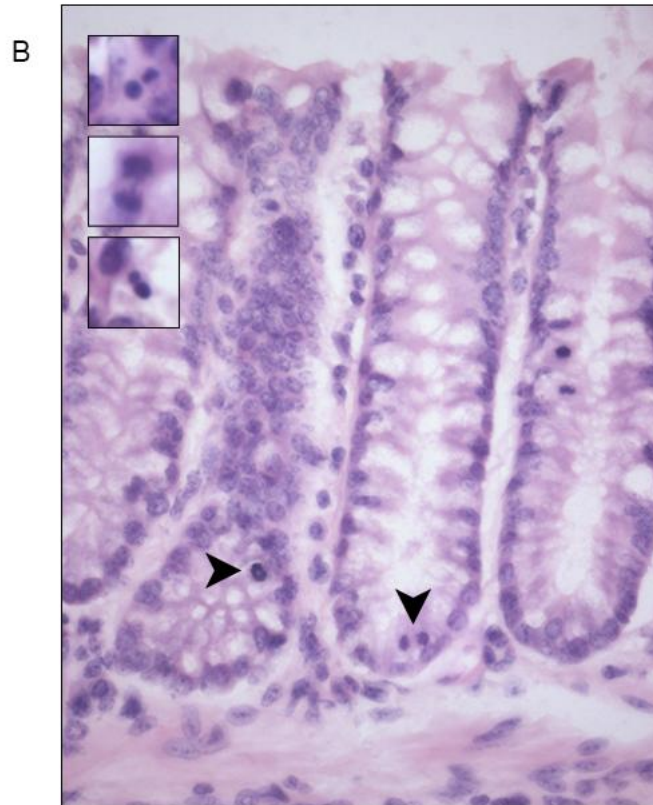
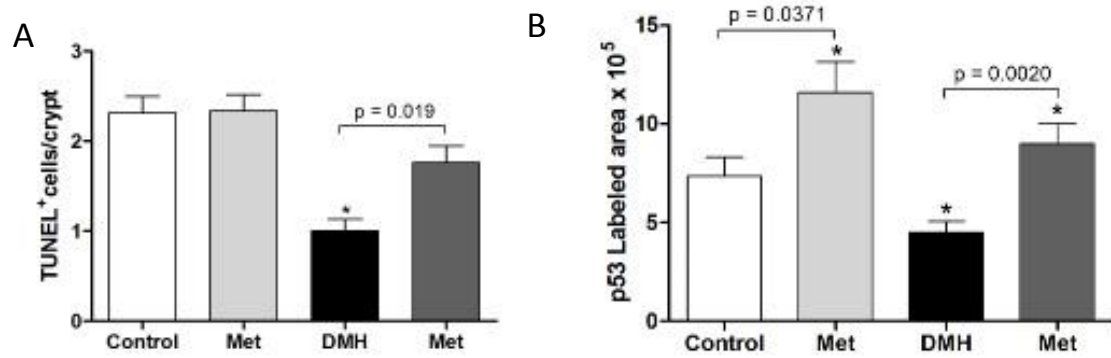
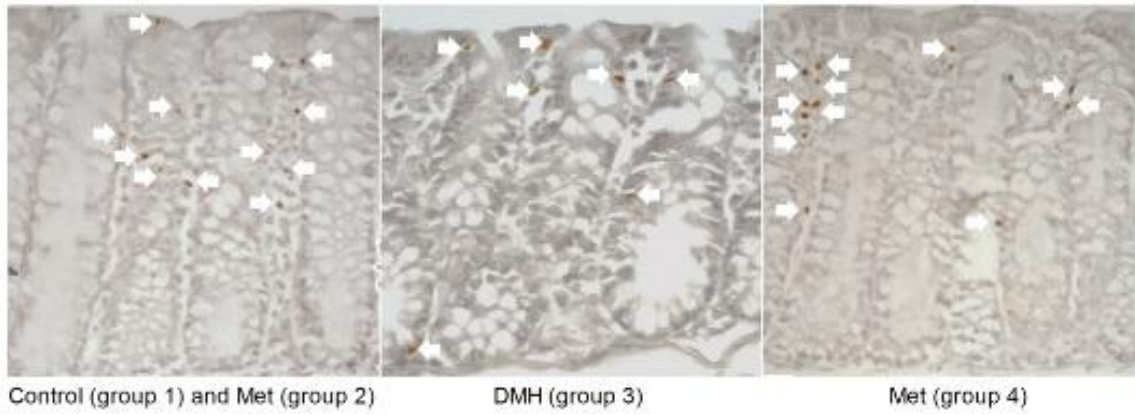


Figure 4



### TUNEL assay



### p53

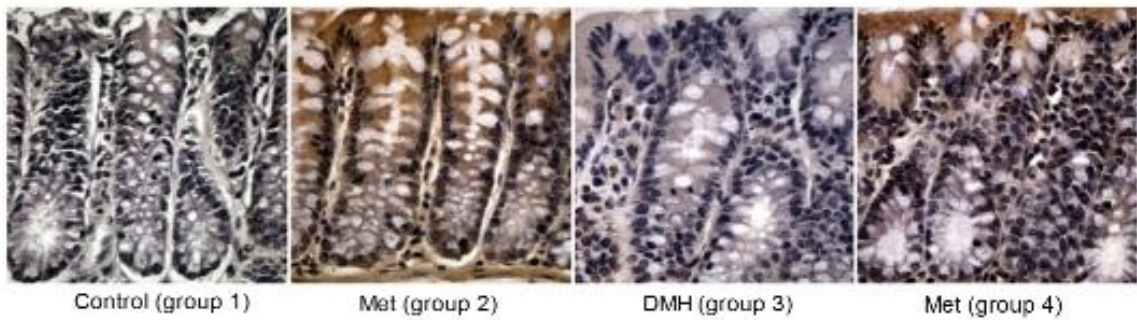
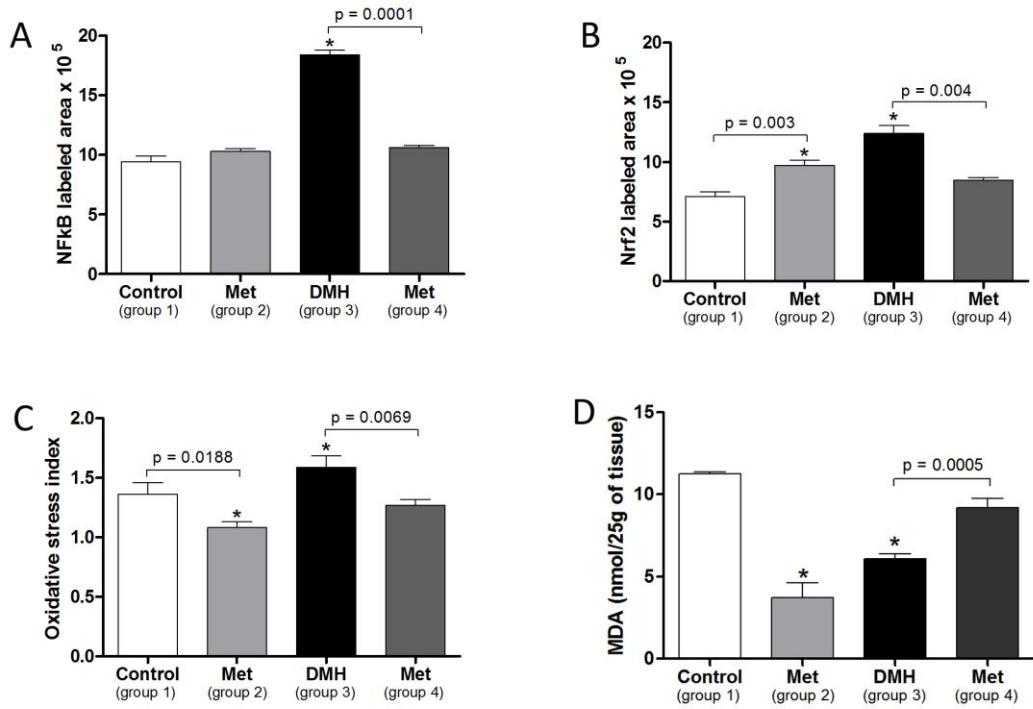
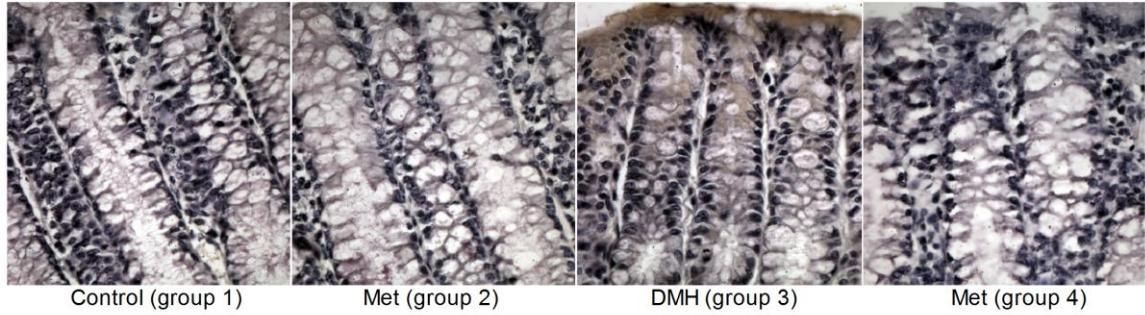


Figure 5



**NFkB**



**Nrf2**

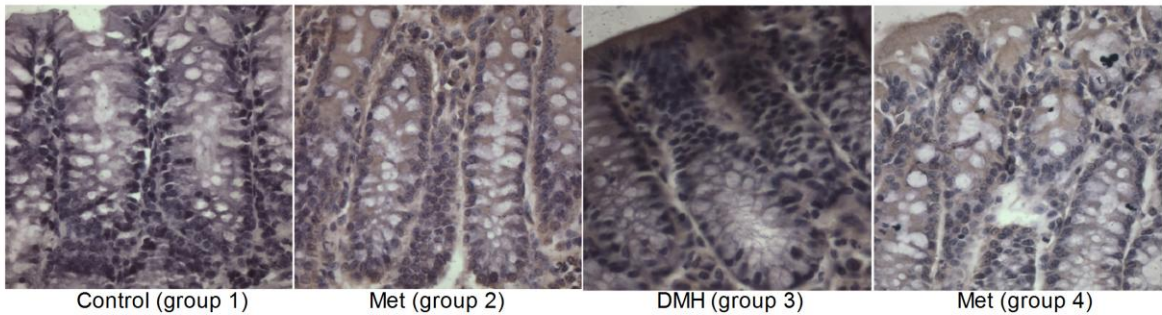
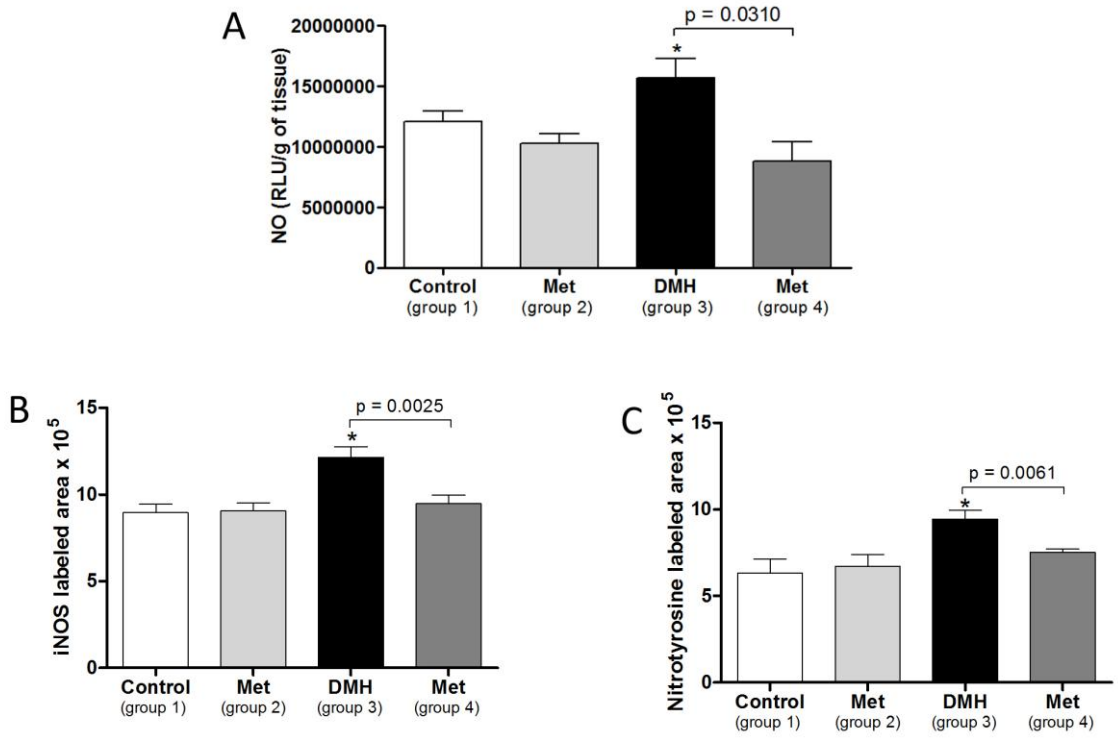
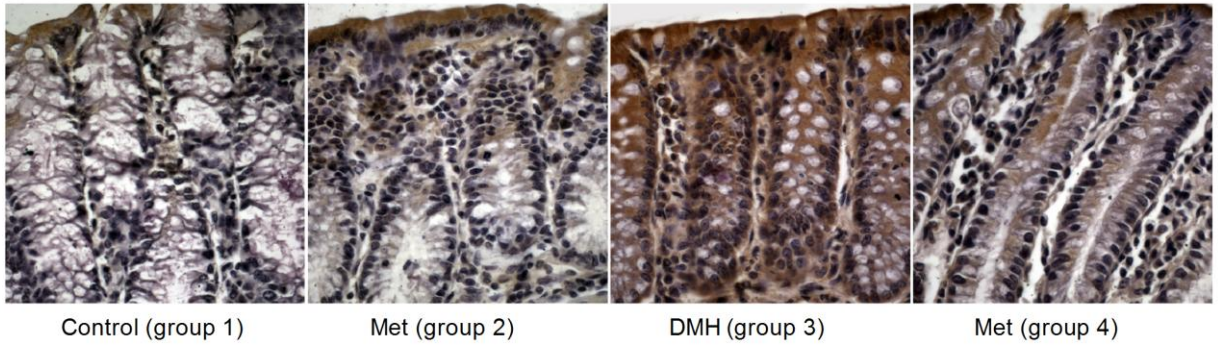


Figure 6



**iNOS**



**Nitrotyrosine**

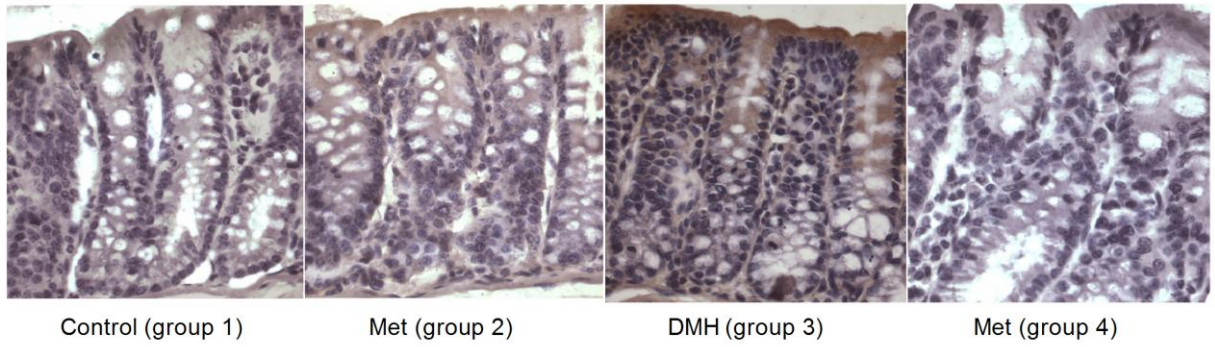
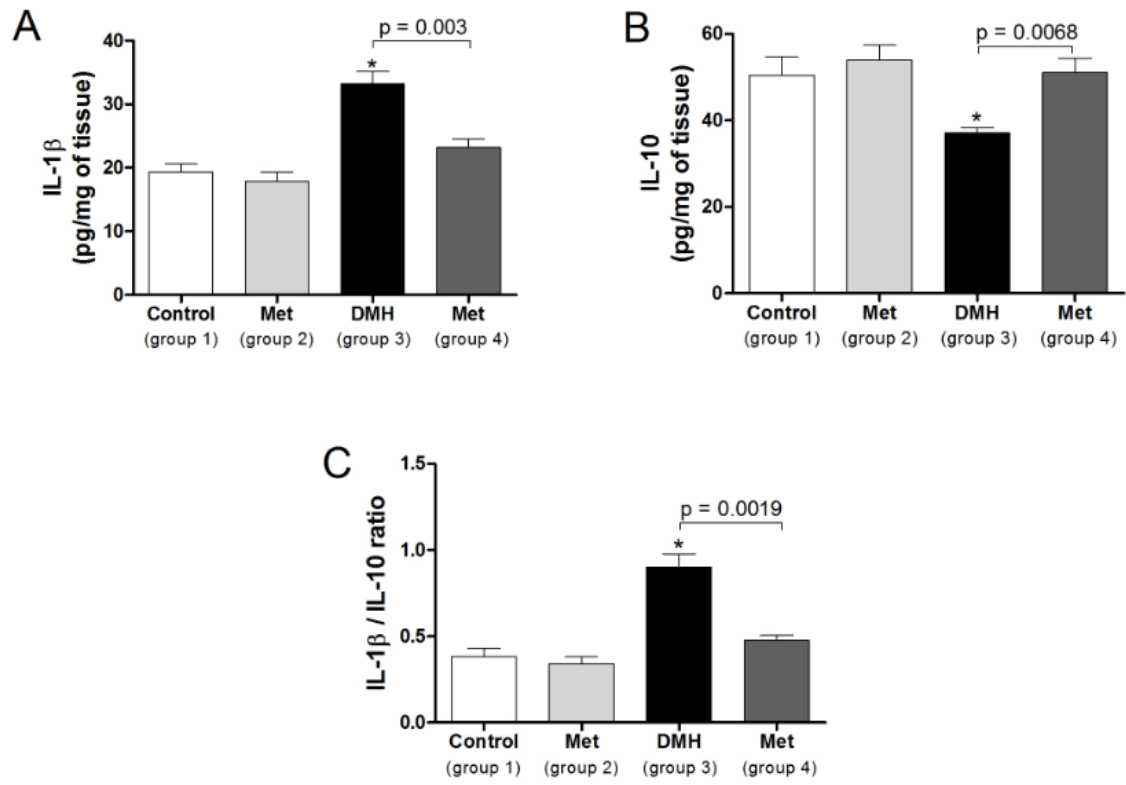


Figure 7



## FIGURE SUBTITLES

Figure 1 - Experimental Design. Seven-week old female Balb/c were treated with or without metformin (50mg/Kg). Mice were injected intraperitoneally with 20mg/Kg 1,2-dimethylhydrazine (DMH) twice a week, for two weeks, and sacrificed 8 weeks after the first DMH injection. Control (Group 1): Mice received normal water and saline injections. Metformin (Group 2): Mice received metformin in the drinking water and saline injections. DMH (Group 3): Mice received normal water and DMH injections. Metformin (Group 4): Mice received DMH injections simultaneously with metformin in the drinking water. Metformin (group 5): Mice received metformin two weeks after the DMH injections.

Figure 2 – Aberrant crypt foci (ACF) and Aberrant crypt (AC) per colon/mice and PAS-Schiff staining. (A) Graphs represent data obtained from large intestine segments (proximal, medial, distal), expressed as mean  $\pm$  SD, and the percentage of reduction, compared to DMH group (x10). \*Difference compared to DMH (group 3),  $p < 0.05$ . Representative image of an intestine divided in three sections. (B) Representative image (40x) for PAS-Schiff staining for mucin detection. The figure on the left represents a normal intestine, without ACF formation, and in the figure on the right, the white arrows indicate ACs without mucin depletion.

Figure 3 - Mitotic Index in H&E staining. (A) Data represents mean results observed in four (4) random histological sections  $\pm$  SD (x40). <sup>a</sup>Difference compared to control (group 1),  $p < 0.05$ . <sup>b</sup>Difference compared to DMH (group 3),  $p < 0.05$ . The analysis considered the location of mitotic figures at high or low portion of the crypt. (B) Representative image of H&E staining in intestinal tissue. Mitotic figures are pointed by the black arrows. Representative chromosomal aberrations are shown inside the squares.

Figure 4: Apoptosis assay by TUNEL and p53 immunohistochemical labeling (40x). (A) For the apoptotic rate (TUNEL), it was analysed the number of apoptotic cells/crypt. In the representative image the white arrows indicate TUNEL-positive cells (400x). (B) Immunohistochemical analysis of p53 labeled area  $\times 10^5$ . \*indicates statistically difference from control (group 1),  $p < 0.005$ . Representative image shows p53 labeling in healthy and ACF colons.

Figure 5 – NFkB and Nrf2 labeling. (A) Figure represents NFkB immunohistochemical staining  $\pm$  SD (x40). Representative image of NFkB labeling in dark brown color. (B) Figure represents Nrf2 immunohistochemical staining  $\pm$  SD (x40). Representative image shows Nrf2 labeling in healthy and ACF colon (x40). (C) Oxidative stress index was calculated from NFkB and Nrf2 labeling data. (D) MDA (malondialdehyde) levels in the intestinal tissue measured by spectrophotometry. \*indicate statistically difference from control (group 1),  $p < 0.05$ .

Figure 6 - Nitric Oxide-related parameters. Figure A shows the results obtained from inducible nitric oxide synthase (iNOS) labeling (x40). Figure B represents nitrotyrosine labeling, and figure C shows the results obtained from nitric oxide (NO) measurement (x40). \*indicate statistically difference from control (group 1),  $p < 0.05$ . Representative image shows iNOS and nitrotyrosine labeling in healthy and ACF colons.

Figure 7 – Cytokines measurement. IL-1 $\beta$  (Figure A) and IL-10 (Figure B) measured by indirect ELISA. Figure C expresses the result obtained from IL-1 $\beta$ /IL-10 ratio. \*indicates statistically difference from control (group 1), and  $p < 0.005$ .

## ANEXO B

## CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade  
Estadual de Londrina

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 57/2014

Londrina, 30 de Abril de 2014.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 8 de Abril de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do efeito protetor da metformina em modelo de câncer colorretal", registrado sobre o processo CEUA nº 3610.2014.08, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o **aprovado** entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 40 camundongos machos Balb/C, com peso aproximado de 22-26g, provenientes do CEMIB da UNICAMP, Campinas-SP. Os animais serão divididos em 5 grupos experimentais, cada um contendo 8 animais. Posteriormente, serão submetidos aos seus respectivos tratamentos, durante 12 semanas, descritos a seguir: 1- controle negativo (EDTA e água *ad libitum*, 2 vezes por semana; 2- controle positivo (DMH-1,2 dimetilhidrazina 2 vezes por semana por 2 semanas e água *ad libitum*); 3- grupo metformina (EDTA 2 vezes por 2 semanas e água *ad libitum*); 4- grupo Simultâneo/ Contínuo (DMH+ metformina 2 vezes por semana por 2 semanas, depois somente metformina); 5- grupo pós-tratamento (somente DMH, 2 vezes por semana por 2 semanas, depois só metformina). Após 12 semanas os camundongos serão eutanasiados por deslocamento cervical. Após esse procedimento, será removido o intestino dos animais para as análises no cólon ascendente e descendente de displasias nos focos de criptas aberrantes, expressão de proteínas intestinais relacionadas com a proliferação celular, vascularização (PCNA, VEGF e B-catenina), apoptose (teste de TUNEL), inflamação (iNOS e COX-2) e estresse oxidativo (TRAP, MDA e NO). Também será analisada a toxicidade medular e hepática pela contagem de reticulócitos, e dosagem de TGO e TGP, respectivamente. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 36 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de pesquisa aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

*Waldiceu Ap. Verri Junior*  
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior  
Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

**Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz**

Departamento de Ciências Patológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 FAX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 6.001 - CEP 86051-990 - Internet <http://www.uel.br>  
Hospital Universitário/Centro de Ciências da Saúde: Av. Robert Koch, 60 - Vila Operária - Fone (043) 381-2000 FAX - Fax 337-4041 e 337-7495 - Caixa Postal 791 - CEP 86038-440  
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL