



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DAIANE SOFIA DE MORAIS PAULINO

**PAPEL QUIMIOPROTETOR DA DIACEREÍNA NO
DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE CÓLON
EM ANIMAIS**

CAMPINAS

2015

DAIANE SOFIA DE MORAIS PAULINO

**PAPEL QUIMIOPROTETOR DA DIACEREÍNA NO
DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE CÓLON EM
ANIMAIS**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do
título de Mestra em Ciências, área de
concentração Clínica Médica.*

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ BARRETO CAMPELLO CARVALHEIRA.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA DAIANE SOFIA DE MORAIS PAULINO, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JOSÉ BARRETO CAMPELLO CARVALHEIRA.

CAMPINAS

2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

P284p Paulino, Daiane Sofia de Moraes, 1987-
Papel quimioprotetor da diacereína no desenvolvimento de câncer de cólon em animais / Daiane Sofia de Moraes Paulino. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: José Barreto Campello Carvalheira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias do colo. 2. Doenças inflamatórias intestinais. 3. Anti-inflamatórios não esteroides. 4. Interleucina-1beta. I. Carvalheira, José Barreto Campello, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Chemoprotective role of diacerein in colon cancer development in animals

Palavras-chave em inglês:

Colonic neoplasms

Inflammatory bowel diseases

Anti-inflammatory agents, Non-steroidal

Interleukin-1beta

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

José Barreto Campello Carvalheira [Orientador]

Carlos Augusto Real Martinez

Marcelo Lima Ribeiro

Data de defesa: 11-01-2016

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

DAIANE SOFIA DE MORAIS PAULINO

ORIENTADOR: JOSÉ BARRETO CAMPELLO CARVALHEIRA

COORIENTADOR:

MEMBROS:

1. PROF. DR. JOSÉ BARRETO CAMPELLO CARVALHEIRA

2. PROF. DR. CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ

3. PROF. DR. MARCELO LIMA RIBEIRO

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 11/01/2016

DEDICATÓRIA

***Dedico este trabalho
aos meus pais, Adriana e Luiz.***

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pelas pessoas que tem colocado no meu caminho.

Ao meu orientador, professor José Barreto, pela oportunidade de poder vivenciar e compartilhar do seu profissionalismo e competência, por todos seus ensinamentos e pela dedicação na conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Oncologia Molecular e do LICRI pelos experimentos compartilhados, pelos almoços, pelas teorias discutidas e pelos bons momentos. Em especial, gostaria de agradecer a Maria Carolina e a Juliana pela amizade construída, pelos finais de semana no laboratório e por toda ajuda na realização deste trabalho.

Ao professor Mario Saad pelo exemplo de liderança e carisma e por permitir a utilização do seu laboratório.

À equipe do biotério e do Labsinzel pelo cuidado com os animais e por serem sempre solícitos a ajudar.

Ao Felipe Osório, pela atenção e calma em me ensinar a avaliar o índice inflamatório do cólon dos animais.

Aos funcionários Sandra, Dioze, Andrey, Jósimo e Sr. Lú muito obrigada por todo o auxílio técnico.

Às minhas companheiras de trabalho, Ester, Flávia, Mãezinha, Solange, Thaís, Maira e toda a equipe de Nutrição do CAISM, pela amizade, pelas refeições juntas, pelos conselhos e apoio para que mais essa etapa fosse concluída.

À minhas amigas da república LEGO, Silvinha, Brunely, Lary, Poly, Ceci, e minhas atuais “flatmates”, Isa e Mari, pela convivência harmoniosa, pelos momentos de risada, pelas festinhas, pelos conselhos, broncas e pelas experiências compartilhadas. Vocês são minha família de Campinas.

Aos amigos do muay thai pela convivência, amizade e por me ajudarem a aliviar o estresse do dia-a-dia.

Aos amigos de infância, Bruno, Adriana e Mariane por acompanharem e fazerem parte de toda a minha trajetória, por estarem sempre me apoiando e torcendo em cada conquista profissional e pessoal.

À minha família, especialmente minhas avós, madrinhas e afilhado, pela torcida, orações, e todo o carinho. Vocês não imaginam o quanto o apoio de vocês é importante para mim.

Aos meus pais pelo exemplo de honestidade, pelo apoio, pelas orações, pelos conselhos, por acreditarem nos meus sonhos e fazerem o possível para que eles se concretizem.

RESUMO

A inflamação impacta diferentes fases da tumorigênese, exercendo efeitos desde a promoção tumoral, até as etapas de sobrevivência, angiogênese e metástase. O processo inflamatório crônico como ocorre nas doenças inflamatórias intestinais, retocolite ulcerativa e doença de Crohn, aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de câncer colorretal (CCR). Dada a relevância epidemiológica do CCR em todo o mundo, o efeito do uso de agentes anti-inflamatórios na quimioprevenção do câncer associado a colite (CAC) ainda é pouco elucidado. O presente trabalho avaliou o papel da diacereína (DAR), um anti-inflamatório não esteroide que atua inibindo a síntese da citocina pró-inflamatória IL-1 β , no câncer associado a colite em animais. A DAR mostrou-se efetiva em reduzir o processo inflamatório no tecido colônico, reduzir o número e tamanho dos tumores de cólon, bem como reduzir a frequência de sangramento e diarreia nos animais com câncer de cólon induzido por azoximentano (AOM) e dextran-sulfato de sódio (DSS). O tratamento com DAR também reduziu os níveis de IL-1 β e a ativação de mediadores inflamatórios intracelulares, como IKK e JNK, no cólon e em tecido tumoral, e aumentou a sobrevivência dos animais. Como esperado, o tratamento com DAR não influenciou o crescimento tumoral em modelos nos quais o desenvolvimento do tumor é primariamente independente do processo inflamatório, como evidenciado nos xenoinxertos com células B16 e HT-29. A DAR não exerceu efeitos sobre os processos de proliferação e apoptose celular. Em consonância, o tratamento com DAR reduziu a atividade de proteínas envolvidas na proliferação celular, como AKT e P70S6K no cólon, mas não no tumor. Dessa forma, os resultados sugerem que a DAR foi capaz de atenuar o processo inflamatório mediante redução da expressão de IL-1 β no cólon dos animais e consequentemente reduziu o desenvolvimento do CAC. Ademais, a DAR revela-se como um potencial agente quimiopreventivo para o câncer de cólon.

Palavras-chave: Câncer de cólon, doença inflamatória intestinal, diacereína, IL-1 β .

ABSTRACT

Inflammation affects different stages of tumorigenesis and it exerts effects in tumor promotion, survival, angiogenesis and metastasis. Chronic inflammation, which occurs in inflammatory bowel disease, as ulcerative colitis and Crohn's disease, significantly increases the risk of developing colorectal cancer (CRC). Considering the epidemiological importance of CCR throughout the world, the effect of anti-inflammatory agents in colitis associated cancer (CAC) chemoprevention is still poorly elucidated. This study aimed to evaluate the role of diacerein (DAR), a non-steroidal anti-inflammatory that acts inhibiting the synthesis of IL-1 β , a proinflammatory cytokine, in CAC in animals. DAR showed to be effective in inhibit inflammation in colonic tissue, reduce the number and size of colon tumors as well as decrease the frequency of rectal bleeding and diarrhea in animals with colon cancer induced by azoxymethane (AOM) and dextran sulfate de sodium (DSS). In parallel, DAR treatment reduced IL-1 β levels and the canonical intracellular inflammatory signaling, such as IKK and JNK, in colon and tumor tissue, as well as increased animals survival. DAR treatment did not affect cancer xenograft growth, which the tumor development is primarily independent of the inflammatory process, as evidenced by B16 and HT-29 cells xenograft. DAR did not exert effect on proliferation and apoptosis cellular. Consistently, the DAR treatment reduced the activity of proteins involved in cellular proliferation, such as p70 and AKT in colon tissue, but not in tumor. Thus, our results indicate that DAR attenuates the inflammatory process by reducing the IL-1 β expression in the colon of animals, and consequently reduced the CAC development. Moreover, our data revealed DAR as a potential chemopreventive agent for colon cancer.

Keywords: Colon cancer, inflammatory bowel disease, diacerein, IL-1 β .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da Diacereína.....	19
Figura 2. Representação esquemática do modelo de indução de câncer de cólon em camundongos.....	23
Figura 3- Número e tamanho tumoral em animais com câncer de cólon induzido por AOM + DSS após tratamento com DAR.	29
Figura 4- Crescimento tumoral em camundongos após xenoenxerto com células B16 e HT-29 e tratamento com DAR	30
Figura 5- Sangramento retal nos animais submetidos a indução de câncer de cólon com AOM +DSS e tratamento com DAR.	31
Figura 6- Diarreia nos camundongos submetidos a indução de câncer de cólon e tratamento com diacereína.....	32
Figura 7- Sobrevida dos animais após câncer de cólon induzido com AOM+ DSS e tratamento com DAR.....	32
Figura 8- Variação ponderal dos camundongos com câncer de cólon induzido, tratados com DAR ou veículo.	33
Figura 9- Índice inflamatório do cólon dos camundongos controles e tratados com DAR, após indução de câncer de cólon.	33
Figura 10- Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no cólon de animais tratados com DAR ou veículo submetidos a indução de câncer de cólon.	34
Figura 11- Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias após tratamento com DAR. .	34
Figura 12- Expressão de proteínas pró-inflamatórias (p-IKK, p-JNK) por imunoblot (IB) no cólon e no tumor de animais Swiss (CTL) e (DAR).....	35
Figura 13- Ação da diacereína na apoptose e proliferação celular.....	36
Figura 14- Expressão de proteínas da via de sinalização de crescimento tumoral (p-AKT, p-P70S6K) por imunoblot (IB) no cólon e no tumor de camundongos Swiss (CTL) e (DAR).	37

LISTA DE ABREVIATURAS

5-ASA	<i>5-aminosalicylic acid</i>	Ácido 5-aminossalicílico
AINEs		Anti-inflamatórios não-esteroides
Akt/PKB	<i>Protein Kinase B</i>	Proteína quinase B
AOM	<i>Azoxymethane</i>	Azoximetano
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	Coleção Americana de Culturas
B16	<i>Mouse melanoma cell line</i>	Linhagem celular de melanoma
BAC	<i>β-actin</i>	β-actina
CAC	<i>Colitis-associated câncer</i>	Câncer associado a colite
CCR		Câncer colorretal
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA		Comitê de Ética no Uso de Animais
COX	<i>Cyclooxygenase enzyme</i>	Enzima Ciclooxygenase
CTL		Controle
DAR	<i>Diacerhein</i>	Diacereína
DC	<i>Crohn's Disease</i>	Doença de Crohn
DII		Doença inflamatória intestinal
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
DSS	<i>Dextran sulfate sodium</i>	Dextran Sulfato de Sódio
DTT	<i>Dithiothreitol</i>	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>	Ácido etilenodiamino tetra-cético

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	Ensaio imunoenzimático
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>	Soro fetal bovino
HT-29	<i>Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line</i>	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
IBD	<i>Inflammatory bowel diseases</i>	Doença Inflamatória Intestinal
IKKβ	Inhibitor of I κ B Kinase β	Inibidor da Kinase I κ B β
IL-1β	<i>Interleukin 1β</i>	Interleucina 1 β
IL-6	<i>Interleukin 6</i>	Interleucina 6
IL-11	<i>Interleukin 11</i>	Interleucina 11
IL-17 A	<i>Interleukin 17 A</i>	Interleucina 17 A
IL-22	<i>Interleukin 22</i>	Interleucina 22
IκB	<i>κB inhibitor of NFκB</i>	Inibidor κ B do NF κ B
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>	Quinase da c-Jun
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>	Alvo mecanístico da rapamicina
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>	Fator nuclear Kappa B
p55		p55 –Receptor do TNF
p70S6K	<i>70kDa S6 Kinase</i>	S6 quinase de 70 kDa
PBS	<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>	Fluoreto de fenilmetil sulfona
qPCR	<i>Quantitative PCR</i>	PCR quantitativo
RCU		Retocolite ulcerativa
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Ácido ribonucleico

SBCAL		Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SC		Subcutaneamente
SDS- PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis</i>	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
STAT 3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>	Fator de crescimento beta
TNF	<i>Fator- de Necrose Tumoral</i>	Fator de necrose tumoral
Tris	<i>(hydroxymethyl)aminomethane</i>	(hidroximetil) aminometano
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-d UTP Nick End Labeling</i>	
UC	<i>Ulcerative colitis</i>	Colite Ulcerativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Processo inflamatório na tumorigênese	16
1.2 Doença inflamatória intestinal na gênese do câncer colorretal.....	17
1.3 Diacereína na quimioprevenção.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Protocolo de Administração de Diacereína.....	22
3.3 Xenoenxerto do Tumor	22
3.4 Indução de tumor de cólon em camundongos	23
3.5 Extração de Tecidos.....	24
3.6 Análise protéica por immunoblotting	24
3.7 Histopatologia tumoral	25
3.8 Imuno-histoquímica	26
3.8.1 Marcação para proliferação celular (Ki-67)	26
3.8.2 Marcação para morte celular (TUNEL).....	26
3.9 Índice Inflamatório Intestinal.....	26
3.10 Análise de citocinas séricas	26
3.11 Análise por PCR em tempo real	27
3.11.1 Extração de RNA e qPCR	27
3.11.2 PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR.....	27
3.12 Análise Estatística.....	28
4 RESULTADOS.....	29

5	DISCUSSÃO.....	38
6	CONCLUSÃO	41
7	REFERÊNCIAS.....	42
8	ANEXO 1.....	53
9	ANEXO 2.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processo inflamatório na tumorigênese

O câncer pode ser compreendido por meio de algumas capacidades biológicas, como habilidade de sustentação do sinal proliferativo, evasão dos supressores tumorais, resistência a apoptose, indução da angiogênese, replicação descontrolada e ativação da invasão e metástase. Sendo que a manutenção dessas funções biológicas do câncer está, entre outros fatores, associada à inflamação (Hanahan e Weinberg, 2011).

A primeira associação entre inflamação e câncer foi proposta por Rudolf Virchow há aproximadamente 150 anos com base em observação histológica de um infiltrado de leucócitos em tecidos tumorais de mama e próstata (Balkwill e Mantovani, 2001). Mais recentemente, esta correlação foi melhor elucidada e tem sido fundamentada por estudos epidemiológicos, farmacológicos, moleculares e genéticos (Calle e Kaaks, 2004; Karin, 2006; Guo *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015). No entanto, ainda há especulações de como a inflamação poderia induzir a tumorigênese, e neste contexto, tem sido sugerido que a inflamação pode induzir o crescimento de células que portam mutações oncogênicas, bem como induzir danos no DNA celular (Takai *et al.*, 2009; Grivennikov, Greten e Karin, 2010).

Ademais, o microambiente inflamatório é reconhecido como um componente essencial para o desenvolvimento tumoral e sua importância na carcinogênese é evidente mesmo naqueles tumores em que não há uma relação causal direta com o processo inflamatório (Mantovani *et al.*, 2008).

Estima-se que no mínimo 20% de todos os cânceres surgem em associação com inflamação crônica e infecção, e mesmo aqueles cânceres que não se desenvolvem como consequência de um processo inflamatório exibem infiltrados de células inflamatórias com altos níveis de expressão de citocinas no microambiente tumoral (Karin e Greten, 2005).

O processo inflamatório por sua vez, pode ser desencadeado de diferentes formas, a exemplo disto, está a inflamação crônica, associada à infecção ou doença autoimune; exposição contínua a fatores ambientais ou obesidade; inflamação produzida pelo próprio tumor e a resposta inflamatória causada pela terapia anticâncer. Além disso, a intensidade

e duração do processo inflamatório são igualmente importantes na tumorigênese (Grivennikov, Greten e Karin, 2010).

Sabe-se também que os processos de proliferação e apoptose celular são fortemente impactados pela inflamação e pelas citocinas inflamatórias produzidas pelas células imunes que infiltram o tecido tumoral, como IL-1 β , IL-6 e TNF, as quais servem como fatores mitogênicos e de sobrevivência para as células pré-malignas e/ou para as cancerígenas. De modo semelhante, a inflamação contribui para o processo de angiogênese e para a ativação de fatores de transcrição oncogênica, como NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) ou STAT 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), os quais tem importante papel na expressão tanto de genes antiapoptóticos como proliferativos, genes responsivos ao estresse e na expressão de quimiocinas (Karin, 2006; Yu, Kortylewski e Pardoll, 2007; Grivennikov e Karin, 2010).

Além disso, quando a arquitetura normal do tecido é perturbada, como ocorre nos casos de injúria tecidual crônica e no câncer, ocorre uma ativação latente de TGF- β (*transforming growth factor beta*), gerando por conseguinte estresse tecidual, o qual limita a apoptose celular e promove a sobrevivência celular programada (Demaria *et al.*, 2010).

Em suma, apesar dos mecanismos implicados na inflamação e carcinogênese ainda não serem completamente compreendidos, a inflamação impacta diferentes fases da tumorigênese, exercendo efeitos diretos desde a proliferação de células tumorais, até as etapas de sobrevivência, angiogênese e metástase (Kraus e Arber, 2009; Grivennikov e Karin, 2010; Allavena *et al.*, 2011; Osório-Costa e Carvalheira, 2013).

1.2 Doença inflamatória intestinal na gênese do câncer colorretal

Tem sido descrito na literatura que a doença inflamatória intestinal (DII), compreendida aqui por duas principais patologias, a retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC), aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de câncer colorretal (CCR) (Gillen *et al.*, 1994; Eaden, Abrams e Mayberry, 2001; Kulaylat e Dayton, 2010). Estima-se que 20% dos pacientes com DII desenvolvem câncer associado a colite (CAC) após 30 anos de doença; e cerca de 3,6% dos pacientes portadores de RCU desenvolvem CCR (Eaden, Abrams e Mayberry, 2001).

Embora, a patogênese do CCR seja multifatorial, o risco de desenvolvimento deste câncer correlaciona-se positivamente com a duração e extensão da DII, presença de colangite esclerosante primária e história familiar de CCR (Collins, Feldman e Fordtran, 1987; Rutter *et al.*, 2004). Ademais, outros fatores de risco potenciais como idade ao diagnóstico, ileíte de refluxo, pseudopólipos e grau da atividade inflamatória são também descritos (Lennard-Jones, 1985; Rutter *et al.*, 2004).

Estudos retrospectivos demonstraram maior risco de neoplasia associado a alta atividade inflamatória por períodos prolongados (Rutter *et al.*, 2004; Rubin *et al.*, 2013). Em concordância, a redução da inflamação e estabilidade da doença inflamatória parece diminuir o risco de CCR (Rubin *et al.*, 2013).

Estudos com colite quimicamente induzida em animais levaram à identificação de citocinas inflamatórias fundamentais na patogênese do CAC. Tal fato pode ser constatado em diferentes estudos, Bromberg e Wang (2009) verificaram correlação entre o aumento dos níveis séricos de IL-6 e incidência de CCR. Popivanova *et al.* (2008) mostraram que a incidência de CCR é drasticamente reduzida em camundongos geneticamente deficiente do receptor TNF. Além disso, a ablação genética de IKK β , uma molécula intracelular envolvida na ativação do NF- κ B por citocinas pró-inflamatórias, foi capaz de atenuar o desenvolvimento de CAC (Greten *et al.*, 2004).

Considerando que, anualmente mais de um milhão de casos novos de CCR são diagnosticados no mundo e que o CCR é a terceira doença mais comum e a quarta causa de morte mais frequente em pacientes com câncer (Tenesa e Dunlop, 2009) o uso de agentes quimiopreventivos tem merecido importante destaque em diversos estudos. Neste sentido, estudos utilizando ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) no tratamento da doença inflamatória intestinal mostrou reduzir o risco de desenvolvimento de CCR (Velayos, Terdiman e Walsh, 2005), contudo outros resultados são contraditórios (Rutter *et al.*, 2004; Ullman *et al.*, 2008). De modo semelhante, compostos com propriedades anti-inflamatórias também foram descritos como tendo efeitos quimiopreventivos na carcinogênese em modelos animais de CCR (Keller e Giardiello, 2003; Arber *et al.*, 2006; Shpitz *et al.*, 2006; Lanas, 2009).

Contudo, apesar dos progressos neste cenário, os efeitos de drogas anti-inflamatórias na prevenção do CAC não é totalmente elucidado (Arber e Levin, 2008).

1.3 Diacereína na quimioprevenção

Um grande número de agentes fármaco-químicos tem sido desenvolvido para o tratamento da inflamação e das doenças que cursam com ela. Esses agentes, em geral, têm como função reduzir a atividade de citocinas específicas ou de seus receptores, bem como reduzir a expressão de moléculas co-estimulatórias de linfócitos-monócitos e depletar linfócitos B (Dinarello, 2010).

Dentre os anti-inflamatórios utilizados no tratamento das doenças inflamatórias crônicas, como as doenças reumatológicas, está a diacereína (DAR). A DAR (1,8-diacetoxy-9,10-dioxo-dihydroanthracene-3-carboxylic acid) é uma antraquinona, que possui como metabolito ativo a reína (1,8-dihidroxy-3-carboxyanthraquinone) (Moore *et al.*, 1998; Nicolas *et al.*, 1998; Moldovan *et al.*, 2000). Este composto é encontrado em plantas do gênero *Cassia* e tem moderada atividade anti-inflamatória e analgésica (Spencer e Wilde, 1997).

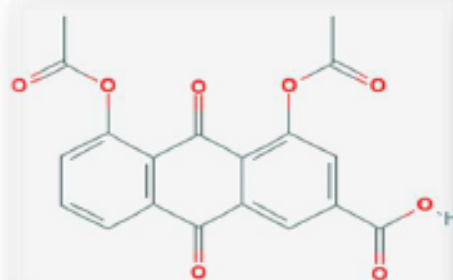


Figura 1. Estrutura molecular da Diacereína

Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a5/Diacerein.svg/200px-Diacerein.svg.png>

Tem sido proposto que a DAR interfere em vias moleculares inibindo a síntese de citocinas, em especial da citocina pró-inflamatória IL-1 β , e consequentemente reduzindo a resposta inflamatória (Moore *et al.*, 1998; Nicolas *et al.*, 1998). Além disso, este composto parece não interferir na síntese de prostaglandinas, apresentando um melhor perfil de segurança quando comparada aos demais anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) (Pelletier *et al.*, 2000).

Estudo com animais demonstrou que a DAR protege contra a migração de leucócitos no processo inflamatório, pela redução dos níveis de IL-1 β e TNF (Pasin *et al.*, 2010). Também tem sido demonstrando, que a DAR suprime o aumento de óxido nítrico plasmático, através da inibição do estímulo inflamatório induzido pela IL-1 β (Tamura e Ohmori, 2001).

Mendes *et al.* (2002) observaram que a diacereína e a reína previnem a ativação do NF- κ B induzida pela IL-1 β , através da degradação do I κ B em cultura de condrócitos. Recentemente, um estudo avaliou os efeitos da DAR na resistência à insulina em animais obesos e foi observada uma melhora na tolerância a glicose, redução da infiltração de macrófagos no tecido adiposo e redução da expressão e atividade de mediadores pró-inflamatórios, com consequente melhoria da sinalização insulínica em tecidos periféricos (Tobar *et al.*, 2011).

A DAR tem sua eficácia após 2-4 semanas de tratamento e efeito prolongado após sua interrupção, apresentando boa absorção por meio de administração oral. A ingestão da DAR concomitante a alimentos aumenta em cerca de 24% sua absorção. Uma vez absorvida, é metabolizada completamente, originando a reína, a qual é distribuída para todos os tecidos. Em adultos saudáveis a reína tem vida útil plasmática de 4,2 horas após a primeira dose de 50 mg e 7,5 horas após a nona dose (doses espaçadas de 12 horas) (Nicolas *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 2000).

A eliminação ocorre principalmente pelos rins (20% na forma inalterada, 60% glucuronídeo e 20% derivados de sulfuronida). A farmacocinética da DAR é semelhante em voluntários saudáveis jovens e pessoas idosas com função normal, tanto após a dose única (50mg) quanto doses repetidas (25–75mg duas vezes ao dia).

Alguns efeitos colaterais do uso da DAR foram descritos, e incluem diarreia, dor abdominal, aumento do trânsito intestinal e alteração da coloração da urina (amarelo-intenso ou tonalidade avermelhada), porém sem significado clínico (Nicolas *et al.*, 1998). Relatos isolados de coceira, vermelhidão ou irritação na pele, pigmentação do cólon e do reto e reações hepáticas também foram descritas (Bianchi Porro *et al.*, 1987).

Apesar da importância e uso frequente da DAR no tratamento das doenças articulares inflamatórias, sua ação no processo inflamatório associado ao câncer permanece desconhecida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da diacereína no desenvolvimento de tumores de cólon induzidos por azoximetano (AOM) e dextran sulfato de sódio (DSS).

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a incidência, número e tamanho dos tumores dos animais submetidos a indução de câncer de cólon tratados com DAR ou veículo.

Avaliar o índice inflamatório no cólon de animais *Swiss* tratados com DAR ou veículo após serem submetidos a indução de câncer de cólon com AOM + DSS.

Avaliar os episódios de sangramento retal e diarreia nos animais após indução de câncer de cólon e tratamento com DAR ou veículo.

Avaliar a sobrevivência dos animais após indução de câncer de cólon e tratamento com DAR ou veículo.

Avaliar os níveis séricos de citocinas inflamatórias nos animais submetidos a indução de câncer de cólon tratados com DAR ou veículo.

Avaliar a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no cólon de camundongos *Swiss* após indução de câncer de cólon e tratamento com DAR ou veículo.

Investigar a ação da DAR na ativação de proteínas da via de sinalização inflamatória, como IKK β e JNK no cólon e no tumor de animais com câncer de cólon induzido por AOM+ DSS.

Investigar a ação da DAR na ativação de proteínas da via de sinalização de crescimento tumoral, como AKT, P70S6K, no cólon e no tumor de animais com câncer de cólon induzido por AOM+ DSS.

Avaliar a ação da DAR nos processos de proliferação e morte celular

Avaliar o crescimento tumoral em animais com xenoinxerto (B16 e HT-29) após tratamento com DAR ou veículo.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos machos das linhagens C57BL/6, NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib, e Swiss com idade de 8 semanas provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (Campinas, SP, Brasil) foram utilizados. Os animais foram mantidos em condições específicas livres de patógenos, em regime de 12 horas de ciclo claro/escuro em sala com temperatura controlada (21°C). Os animais receberam dieta padrão AIN-93 (proteína 20%, carboidrato 70% e lipídio 10%) e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), em acordo com lei vigente nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 e o decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009. Os experimentos receberam aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP, segundo protocolo nº 3350-1 (Anexo 1).

3.2 Protocolo de Administração de Diacereína

A DAR, proveniente da TRB-Pharma (Campinas, SP, Brasil), foi diluída em PBS 0,01M para obtenção de uma concentração final de 5 mg/ml. O grupo tratado com DAR recebeu uma dose de 50 mg/kg/dia, enquanto o grupo controle recebeu apenas o veículo (PBS 0,01M). O tratamento dos animais foi realizado por meio de gavagem diária.

3.3 Xenoenxerto do Tumor

As linhagens celulares B16 (melanoma) e HT-29 (câncer de cólon) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Filadélfia, PA, USA); cultivadas em meio apropriado de acordo com recomendações da ATCC, com adição de penicilina/streptomicina e anfotericina B; mantidas a 37°C e em incubadora de CO₂.

Essas células (1×10^6) ressuspensas em 100µl do meio de cultura sem soro fetal bovino (FBS) foram inoculadas subcutaneamente (SC) na região dorsal dos camundongos. A linhagem de câncer de pele (B16) foi inoculada no modelo animal

C57BL/6, enquanto a célula HT-29 foi inoculado nos animais NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib.

Em ambos os xenoenxertos, os animais foram divididos em 2 grupos (CTL e DAR) e tratados após o tumor atingir volume igual a 50 mm³. Os animais com xenoenxerto de B16 receberam tratamento por 13 dias, e os animais com xenoenxerto de HT-29 foram tratados por 23 dias. Durante todo o tratamento o tumor foi mensurado diariamente e seu volume estimado através da fórmula: $V = W \times L [(W + L)/2] \times 0,52$, na qual W e L são o menor e o maior diâmetro. O peso dos animais também foi obtido diariamente. Ao final, os camundongos foram sacrificados.

3.4 Indução de tumor de cólon em camundongos

O carcinógeno AOM, da Sigma®, foi injetado intraperitonealmente nos animais da linhagem Swiss na dose 12,5 mg/kg. Sete dias após aplicação do AOM os animais receberam o tratamento com DSS (MP Biomedicals, LLC, France) a 2,5% (MW36–50 kDa) na água a eles oferecida por um período de cinco dias. Na quinta e oitava semana após o tratamento com AOM, repetiu-se o tratamento com DSS (Popivanova, *et al.*, 2008). Dez dias após o último tratamento com DSS os animais foram sacrificados (Figura 2). Concomitante com a administração do AOM os animais foram randomicamente divididos em 2 grupos (CTL e DAR) e tratados durante todo o protocolo. Semanalmente mensurou-se o peso dos animais e diariamente avaliou-se a ocorrência de sangramento retal e diarreia.

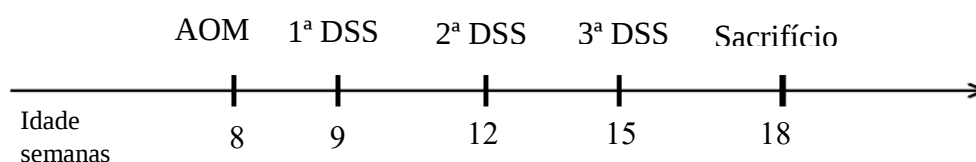


Figura 2. Representação esquemática do modelo de indução de câncer de cólon em camundongos

3.5 Extração de Tecidos

Os animais receberam anestesia intraperitoneal com Tiopental (15 mg/kg) e foram utilizados após abolição do reflexo corneano e retirada da pata a dor. Fez-se avaliação macroscópica dos tecidos (tumores, cólon, fígado e baço), os quais foram extraídos e submetidos aos procedimentos de análise, como descrito abaixo.

3.6 Análise protéica por immunoblotting

Os tecidos extraídos foram prontamente colocados em tampão de extração 1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM fluoreto de fenilmetanossulfonila e 0.1mg/ml aprotinina e homogeneizados com politron PTA 20S (Generator, Brinkmann Instruments model PT 10/35). Em seguida, realizou-se a centrifugação dos tecidos extraídos a 4°C (Bioanalytical) a 12.000 rpm por 40 minutos; utilizou-se parte do sobrenadante para determinação da concentração protéica por fragmento de tecido extraído e outra parte foi utilizada para aplicação do gel de sódio dodecil sulfato de poliácridamida (SDS-PAGE). A determinação da concentração protéica foi realizada por método fotolorimétrico do reagente biureto (Bradford, M.M., 1976) da Bio Rad.

O sobrenadante das amostras foi aliquoteado com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970) acrescido de ditioneitol (DTT) 200mM, numa proporção de 1:5. Este material foi então, fervido a 100°C por 5 minutos e submetido à eletroforese de gel de poliácridamida.

Os aparelhos, bem como os reagentes para o SDS-PAGE foram da Bio-Rad (Richmond, CA). Tampão TRIS-HCl, fluoreto de fenilmetanossulfonila (PMSF), DTT e aprotinina, foram da Sigma *Chemical Co.* (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2µm) foi de *Schleicher & Schuell*.

Utilizou-se marcador de alto peso molecular da Bio Rad para balizar o gel. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel também da Bio Rad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. Na passagem pela fase de empilhamento (stacking), o SDS-PAGE foi submetido a 30 volts, enquanto na fase de resolução do gel, este foi submetido a 100 volts.

A transferência das proteínas separadas no gel para uma membrana de nitrocelulose foi realizada através de aparelho da Bio Rad por 90 minutos a 120 volts, como descrito por Towbin, Staehelin e Gordon (1979).

Após a etapa de transferência, as membranas foram colocadas em solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) por duas horas a temperatura ambiente com o intuito de reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos à membrana de nitrocelulose. Em seguida, estas membranas foram lavadas, em solução basal, e incubadas com anticorpos específicos: anti-phospho-AKT ser473 (Cell Signaling Technology, Cell-9271), anti-phospho-P70S6K thr389 (Cell Signaling Technology, Cell-9205), anti-phospho-JNK Thr183/Tyr185 (Santa Cruz Biotechnology, SC-12882-R), anti-phospho-IKK Ser180/Ser181 (Santa Cruz Biotechnology, SC-23470-R) e anti- β -Tubulina (Cell Signaling Technology, Cell-2146); mantidas *overnight*, a uma temperatura de 4°C sob agitação contínua. Após este procedimento as membranas foram outra vez lavadas com solução basal por dez minutos, a lavagem foi repetida outras 2 vezes. Então as membranas foram incubadas por 2 horas em solução bloqueadora (leite desnatado Molico 3%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) com anticorpos *anti-rabbit* e *anti-mouse* IgG secundários conjugados com peroxidase da KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., USA) e após esse período lavadas 3 vezes por 10 minutos em solução basal. A seguir, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, da Pierce, em agitação constante por cerca de três minutos, sendo, posteriormente, reveladas na fotodocumentadora Biorad.

Por fim, realizou-se a análise dos dados, comparando-se o tecido do animal controle com o tecido do animal tratado com DAR.

3.7 Histopatologia tumoral

Fez-se biópsia do cólon de camundongos Swiss, seguida por imersão em paraformol 4% por 24 horas para fixação. Subsequentemente, o tecido extraído foi desidratado com diferentes concentrações de etanol e processado para ser embebido em parafina. As secções foram cortadas, retiradas da parafina e coradas (Hematoxilina e Eosina) para determinação da morfologia tecidual e do índice inflamatório intestinal.

3.8 Imuno-histoquímica

3.8.1 Marcação para proliferação celular (Ki-67)

Para detecção da marcação Ki-67, as lâminas com tecido do cólon foram desparafinizadas, permeabilizadas com tampão de citrato a 0,01 mol/l e pH igual a 6 e aquecidas 2 vezes (com intervalo de 2 minutos entre cada aquecimento), em forno de micro-ondas doméstico a 700W por 7 minutos. Após aquecimento, as lâminas foram resfriadas a temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se bloqueio com peroxidase endógena (1% H₂O₂ em metanol) por 15 minutos, e tratamento com proteinase K (20 µg/mL) por 30 minutos. As lâminas foram então incubadas com anticorpo monoclonal para Ki-67 clone MIB-1 anti-humano (*Dako Cytomation*) (diluído 1:1000) *overnight*, a 4°C. Por fim, as lâminas foram incubadas com o kit LSAB+ e complexadas com avidina-biotina (*Dako Cytomation*) por 30 minutos, seguido da adição de tetrahidrocloretodiaminobenzidina (DAB) (*Sigma Aldrich*) como substrato cromógeno.

Após coloração com hematoxilina e desidratação, as lâminas foram montadas em Entellan (*Merck, Darmstadt, Alemanha*).

3.8.2 Marcação para morte celular (TUNEL)

Utilizou-se Kit comercial (Upstate- 17 141), para detecção da coloração do *Terminal deoxynucleotidylTransferaseBiotin-d UTP Nick EndLabeling* (TUNEL) (detecção de apoptose) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.9 Índice Inflamatório Intestinal

Para determinação do índice inflamatório do cólon de camundongos Swiss seguiu-se critério morfológico descrito por Cooper *et al.* (1993).

3.10 Análise de citocinas séricas

Os níveis séricos das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF de animais Swiss, submetidos a indução de câncer de cólon, foram determinados através de técnica de ELISA (Pierce Endogen, Rockford, IL), conforme manual de instruções fornecido pelo fabricante.

3.11 Análise por PCR em tempo real

3.11.1 Extração de RNA e qPCR

Cólon de camundongos Swiss foi extraído e homogeneizado em Trizol. O RNA total foi isolado conforme recomendações do fabricante e quantificado em espectrofotômetro por leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260 nm. Fez-se verificação da pureza da amostra analisando a razão $A_{260}:A_{280}$ e considerou-se pura amostra no valor entre 1.8 a 2.0. Afim de eliminar qualquer contaminação do RNA extraído com DNA, 1 µg de cada RNA extraído foi tratado com a enzima *double-strand specific DNase* (Thermo Scientific, MA USA) através da reação: 10X dsDNase Buffer e 1X da enzima *dsDNase*, em volume final de 10 µL. A reação foi incubada por 2 min à temperatura de 37 °C. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA previamente tratado com *dsDNase I* (reação de transcrição reversa), usando o kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Thermo Scientific) e seguindo as instruções do fabricante. A concentração de cDNA sintetizada foi determinada usando o espectrofotômetro, através da leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260 nm.

3.11.2 PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR

Utilizou-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems MA USA,) para a realização das reações de PCR em tempo real. Este sistema é composto por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para amplificação gênica, utilizou-se os primers TNF (Mn00443260), IL-1β (Mn00434228) e IL-6 (Mn00446190). O gene β-actina (BAC) (TaqMan™ - AppliedBiosystems) foi utilizado para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras, servindo então como controle endógeno da reação. A sonda BAC foi marcada com o fluoróforo VIC, já os primers TNF, IL-1β e IL-6 com o fluoróforo FAM.

Realizou-se reação em triplicata para quantificação relativa dos genes, utilizando-se: 10 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 1µL de TaqMan Gene Expression Assay 20x e 100 ng de cDNA. As condições de ciclagem foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os programas QuantStudio™ 7 Software v1.0 (Applied Biosystems) and DataAssist™ Software v3.01 (Life Technologies) foram utilizados para análise dos dados.

3.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como Média $\pm$ Erro Padrão (EP) de pelo menos três experimentos independentes. A comparação entre os grupos foi realizada por meio de teste-t de Student. Considerou-se significância estatística valores de $p < 0,05$. Para análise de curvas de Kaplan-Meier foi utilizado o teste log-rank desestratificado. Medidas de ANOVA foram utilizadas para comparar a eficácia do tratamento para o sangramento retal e diarreia. O nível de significância adotado foi de p-valor inferior a 0,05. Para análise dos dados utilizou-se Stata (versão 12; StataCorp, College Station, TX) e GraphPad Prism, versão 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

Afim de avaliar os efeitos da DAR no tratamento do câncer de cólon utilizou-se o protocolo de indução com AOM + DSS como modelo de CAC. O tratamento com DAR não alterou a incidência tumoral (CTL = 89,6%; DAR = 88,8%; $p = 0,92$). Contudo, os animais tratados com DAR apresentaram redução do número (CTL = $9,86 \pm 1,53$; DAR = $5,58 \pm 0,96$; $p = 0,016$) e do tamanho dos tumores de cólon (CTL = $3,38 \pm 0,28$ mm; DAR = $1,77 \pm 0,17$ mm; $p < 0,001$) (Figura 3A-B).

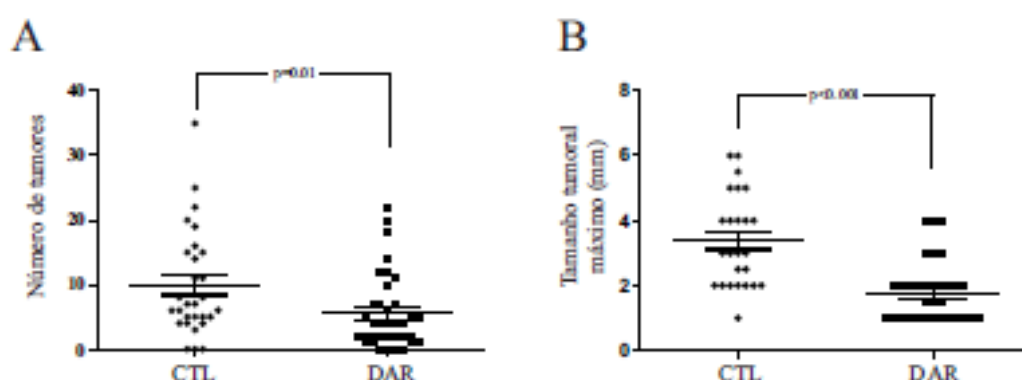


Figura 3- Número e tamanho tumoral em animais com câncer de cólon induzido por AOM + DSS após tratamento com DAR. Legenda: (A) Quantificação do número de tumores (n=29-36 animais/grupo) e (B) Tamanho tumoral (n = 25-33 animais/grupo). Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP).

Com o propósito de verificar se a redução no crescimento e desenvolvimento tumoral estavam relacionados a ação anti-inflamatória da DAR na célula tumoral realizou-se xenoenxertos de duas linhagens celulares diferentes (B16 e HT-29), nas quais o desenvolvimento do tumor é primariamente independente da inflamação. A célula B16 (melanoma) foi inoculada nos animais C57Bl/6 e a linhagem celular HT-29 (câncer de cólon) foi inoculada nos animais NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib, como descrito anteriormente. Não se observou diferença significativa no crescimento tumoral da linhagem celular B16 nos animais tratados com DAR em relação ao grupo controle (CTL = $1166 \pm 365,6$ mm³; DAR = $1040 \pm 373,4$ mm³; $p = 0,81$). O mesmo foi observado nos

animais inoculados com HT-29 (CTL = $281,2 \pm 54,65 \text{ mm}^3$; DAR = $369,5 \pm 59,03 \text{ mm}^3$; $p=0,28$) (Figura 4 A-B).

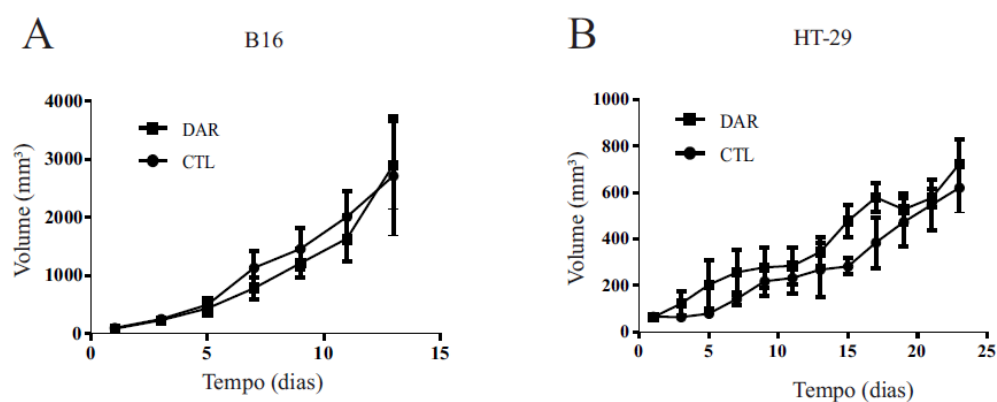


Figura 4- Crescimento tumoral em camundongos após xenoenxerto com células B16 e HT-29 e tratamento com DAR. Legenda: (A) Curva de crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 após xenoenxerto com B16 (melanoma) nos grupos (CTL) e (DAR) ($n = 9-10$ animais/grupo). (B) Curva de crescimento tumoral em camundongos NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib após xenoenxerto com HT-29 (câncer de cólon) ($n = 6-7$ animais/grupo). Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP).

A indução de câncer de cólon com AOM + DSS comumente ocasiona sangramento retal e diarreia nos animais, então resolveu-se avaliar se o tratamento com DAR seria capaz de atenuar esses parâmetros clínicos. Neste sentido, os resultados demonstram que não houve diferença no tempo médio do primeiro episódio de sangramento retal entre os grupos, sendo que os camundongos tratados com DAR apresentaram o primeiro episódio com 23,5 dias, enquanto, os camundongos do grupo CTL apresentaram o primeiro episódio com 26 dias (Figura 5A). No entanto, a DAR foi capaz de reduzir a intensidade do sangramento retal, aqui mensurado pelo número de episódios de sangramento ao longo do tempo (Figura 5B).

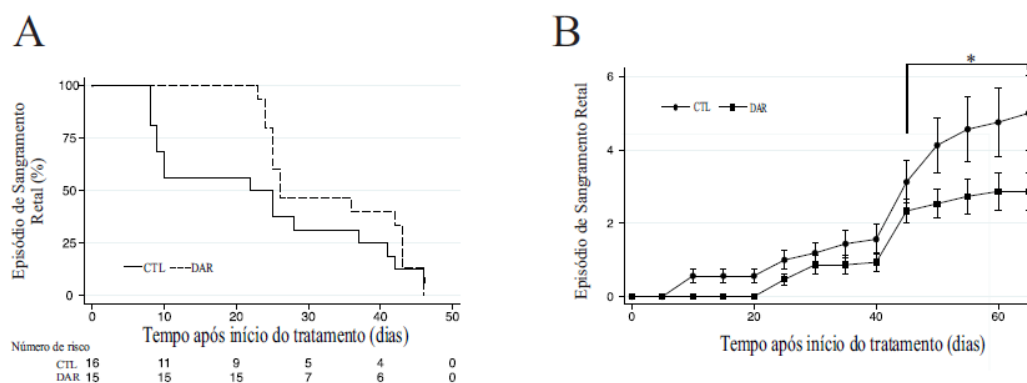


Figura 5- Sangramento retal nos animais submetidos a indução de câncer de cólon com AOM +DSS e tratamento com DAR. Legenda: (A) Tempo médio do primeiro episódio de sangramento retal; (B) Número de episódios de sangramento retal ao longo do tempo. (n = 15-16 animais/grupo). *P<0.05.

Com relação a diarreia, encontrou-se diferença no tempo médio do primeiro episódio entre os 2 grupos, sendo que o grupo DAR teve o primeiro episódio de diarreia mais tardiamente, quando comparado ao grupo CTL (mediana não atingida vs 28 dias, respectivamente; $p < 0.01$ pelo teste de log rank) (Figure 6A). Além disso, a Figura 6B demonstra que o tratamento com DAR reduziu significativamente o número de episódios de diarreia ($p < 0.01$).

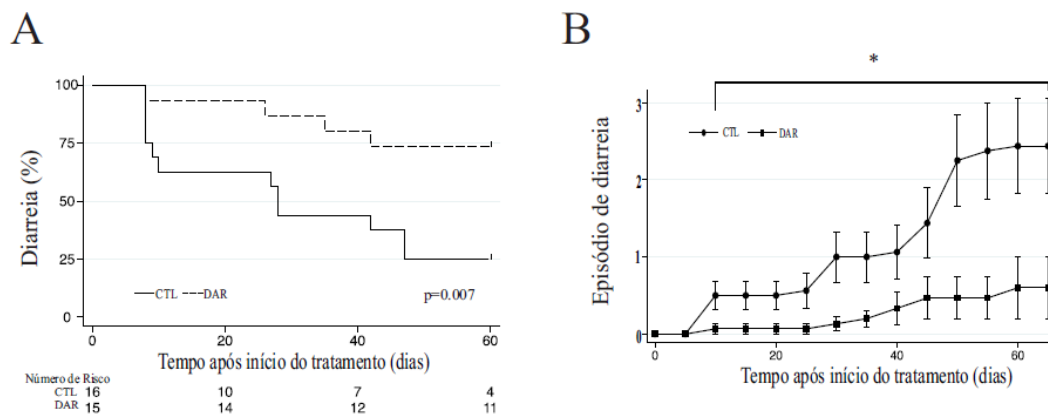


Figura 6- Diarreia nos camundongos submetidos a indução de câncer de cólon e tratamento com DAR. Legenda: (A) Tempo médio do primeiro episódio de diarreia e (B) Número de episódios de diarreia ao longo do tempo, grupo controle (CTL) e grupo tratado com diacereína (DAR) ($n = 15-16$ animais/grupo). * $P < 0.05$

O tratamento com DAR promoveu aumento significativo na sobrevida dos animais ($p = 0,03$), como mostrado na Figura 7.

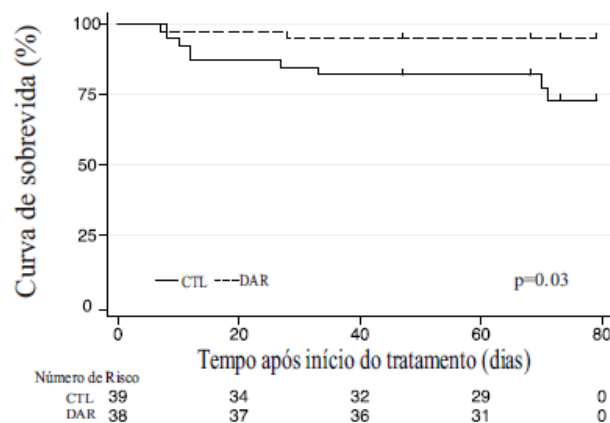


Figura 7- Sobrevida dos animais após câncer de cólon induzido com AOM+ DSS e tratamento com DAR. Legenda: Curva de sobrevida de animais Swiss CTL e tratados com DAR ($n = 38-39$ animais/grupo). * $P < 0.05$.

Não se observou alterações ponderais nos animais após tratamento com DAR (CTL = $2,81 \pm 0,49\text{g}$; DAR = $3,27 \pm 0,53\text{g}$; $p = 0,53$) (Figura 8).

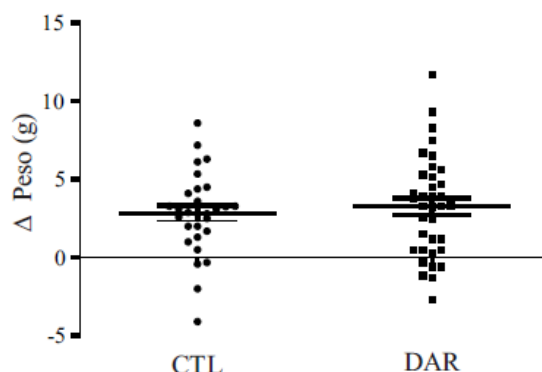


Figura 8- Variação ponderal dos camundongos com câncer de cólon induzido, tratados com DAR ou veículo. Legenda: Variação do peso corporal dos camundongos após tratamento com veículo ou DAR (n = 29-36 animais/grupo).

Análise do índice inflamatório do cólon dos animais submetidos a tratamento com AOM + DSS mostrou redução significativa na inflamação intestinal do grupo tratado com DAR comparado ao grupo CTL ($p < 0,01$) (Figura 9).



Figura 9- Índice inflamatório do cólon dos camundongos controles e tratados com DAR, após indução de câncer de cólon. Legenda: Índice inflamatório e representação microfotográfica de secções do cólon coradas com Hematoxilina e Eosina (ampliação 5X) em animais CTL e tratados com DAR; escala: 100μm; (n = 5 animais/grupo). Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP).

Também foi avaliada a expressão gênica de IL-1 β , TNF e IL-6 no cólon destes animais, e verificou-se redução significativa nos níveis de IL-1 β ($p=0,01$), mas não de TNF ($p=0,12$) e IL-6 ($p=0,13$) (Figura 10).

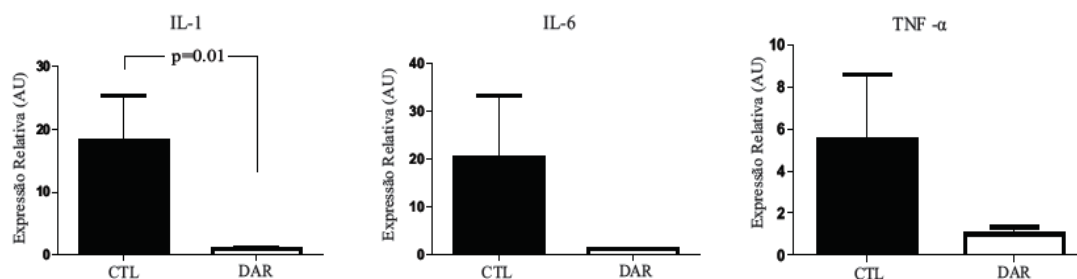


Figura 10- Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no cólon de animais tratados com DAR ou veículo submetidos a indução de câncer de cólon. Legenda: Análise quantitativa da expressão gênica de IL1 β , IL-6 e TNF no cólon de Swiss, através RT-PCR ($n=17-18$ animais/ grupo). Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP).

Em contrapartida não se observou redução significativa nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF e IL-6 dos animais tratados com DAR comparado ao grupo CTL (Figura 11).

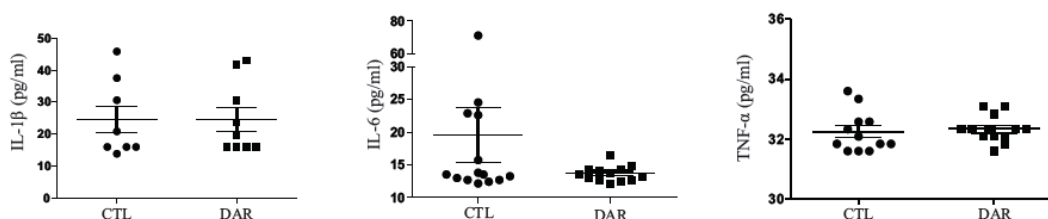


Figura 11- Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias após tratamento com DAR. Legenda: Quantificação dos níveis séricos de IL-1 β ($n=8-9$ animais/grupo), IL-6 ($n=14-13$ animais/grupo) e TNF ($n=12-13$ animais/grupo), por ELISA. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP).

Tampouco observou-se alteração no peso relativo do baço (CTL = $0,40 \pm 0,08$ g/100g de peso do animal; DAR = $0,31 \pm 0,03$ g/100g de peso do animal; $p = 0,27$) e do fígado (CTL = $4,50 \pm 0,14$ g/100g de peso do animal; DAR = $4,32 \pm 0,12$ g/100g de peso do animal; $p = 0,38$) entre os grupos, o que sugere que os efeitos da DAR no processo inflamatório relacionado a carcinogênese estejam ocorrendo apenas no tecido alvo (cólon).

Consistente com esses achados, o tratamento com DAR inibiu a ativação das proteínas IKK e JNK, as quais são proteínas chaves da via de sinalização inflamatória, no cólon e no também no tumor dos camundongos Swiss (Figura 12).

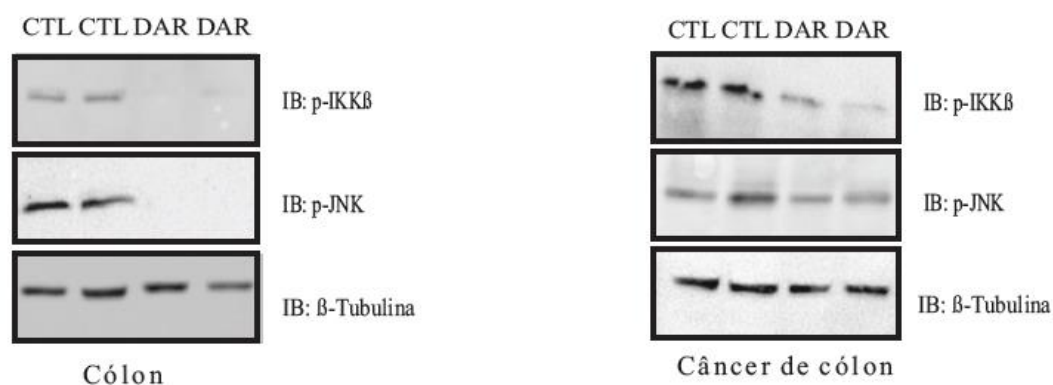


Figura 12-Expressão de proteínas pró-inflamatórias (p-IKK, p-JNK) por immunoblot (IB) no cólon e no tumor de animais Swiss (CTL) e (DAR).

Também foi avaliado se os efeitos do tratamento com DAR seriam capazes de modular a proliferação celular e induzir a apoptose no tecido tumoral, para tanto realizamos os ensaios Ki-67 e TUNEL respectivamente. Entretanto, não se observou diferença na proliferação celular (CTL = $16,92 \pm 1,05\%$; DAR = $17,16 \pm 1,97\%$; $n = 5$; 5 campos por secção do cólon), da mesma forma, não se constatou diferença na apoptose das células (CTL = $63.94 \pm 3.98 \%$; DAR = $69.68 \pm 2.28 \%$; $p = 0.24$; $n = 5$; 5 campos por secção do cólon) (Figura 13 A-B).

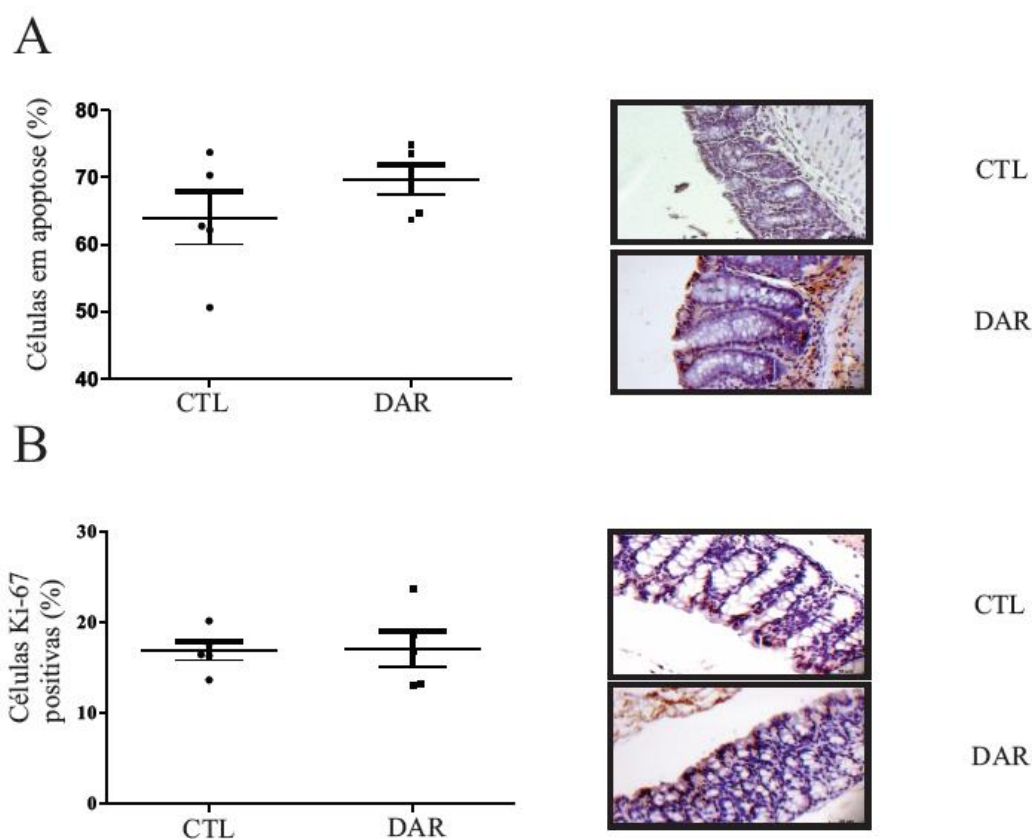


Figura 13- Ação da diacereína na apoptose e proliferação celular. Legenda: (A) Quantificação da porcentagem de células em apoptose (TUNEL – terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) e representação microfotográfica de secções do cólon de camundongos CTL e DAR (ampliação 40X); escala: 50 μ m; $n = 5$; 5 campos por secção do cólon, média $\pm$ EP. (B) Quantificação da porcentagem de células Ki-67⁺ e representação microfotográfica de secções do cólon de camundongos Swiss CTL e DAR (ampliação 40X); escala: 50 μ m, $n = 5$; 5 campos por secção de tecido colônico, média $\pm$ EP.

Como demonstrado na Figura 14, a DAR modulou a atividade de proteínas da via de sinalização do crescimento tumoral, como AKT (Ser 473) e p70S6K (Thr 389) apenas no cólon. Suportando assim, a hipótese de que os efeitos anti-câncer da DAR são mediados pela modulação do processo inflamatório no tecido alvo e não por sua ação direta na célula tumoral.

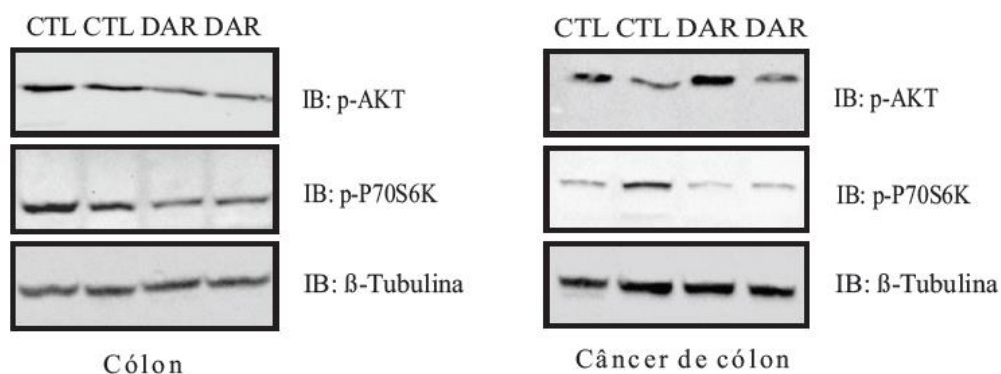


Figura 14- Expressão de proteínas da via de sinalização de crescimento tumoral (p-AKT, p-P70S6K) por imunoblot (IB) no cólon e no tumor de camundongos *Swiss* (CTL) e (DAR).

5 DISCUSSÃO

Este estudo investigou o papel da DAR, um AINE, no desenvolvimento do CAC quimicamente induzido com AOM+DSS em modelo animal. E foi possível identificar redução no número e tamanho dos tumores de cólon, bem como redução do processo inflamatório no tecido colônico nos animais tratados com DAR. Essa capacidade da DAR em prevenir o CAC foi associada a redução dos níveis de IL-1 β no cólon e redução da ativação dos mediadores inflamatórios intracelulares IKK e JNK.

Entre os modelos de CAC, a combinação do AOM (um agente mutagênico) com o DSS (um irritante químico) tem sido muito utilizada por ser altamente reprodutível, por mimetizar o desenvolvimento de criptas aberrantes como ocorre no CRC humano, pela praticidade e confiabilidade no estudo da carcinogênese associada a inflamação (De Robertis *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014).

O câncer é a mais grave complicação do processo inflamatório crônico inerente as DII e apesar do risco substancialmente aumentado dos pacientes com RCU desenvolverem CRC (Jess, Rungoe e Peyrin-Biroulet, 2012), o uso de agentes com potencial anti-inflamatório na prevenção do CRC ainda é controverso. Além disso, a baixa taxa de sobrevida no CRC avançado (Arber e Levin, 2008), fortalece a necessidade de ações preventivas, como o uso de substâncias que possam inibir ou mesmo interferir na progressão de adenoma para carcinoma colorretal. Vários AINEs, como piroxicam, indometacina, sulindaco, ibuprofeno e aspirina, já foram testados na quimioprevenção do CAC (Dubois e Smalley, 1996; Yamamoto *et al.*, 1999; Half e Arber, 2009), entretanto, esta pesquisa é pioneira em testar os efeitos da DAR no CAC.

Diferentemente da maioria dos AINEs, os efeitos antineoplásicos da DAR não são dependentes da inibição da enzima ciclooxigenase (COX). Tal característica confere a DAR maior tolerância gastrointestinal, além disso, a associação com maior risco de eventos cardiovasculares tem limitado a aplicação clínica de AINEs inibidores de COX (Bertagnolli *et al.*, 2006).

A DAR age inibindo a produção da citocina IL-1 β , que é um importante mediador de inflamação intestinal, e cujos níveis estão aumentados no CAC (Marszałek *et al.*, 2012). Um trabalho recente mostrou que a ativação do eixo IL-1 β / IL-17A no intestino

estava relacionado a promoção da carcinogênese associada a colite (Ning *et al.*, 2015). De forma semelhante, nesse estudo a redução dos níveis de IL-1 β no cólon foi suficiente para prevenir a ocorrência de CAC, mesmo sem ter influenciado a expressão das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF, as quais já foram descritas em diversos trabalhos como elementos cruciais na promoção do câncer associado a inflamação (Becker *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2008; Popivanova *et al.*, 2008).

Mais recentemente, as citocinas IL-11, IL-17A e IL-22 também foram associadas a promoção do CRC tanto em modelos animais como em humanos (West *et al.*, 2015); entretanto, os efeitos da DAR nessas citocinas não foram abordados nesse trabalho.

Estudos clínicos tem sugerido que níveis séricos de IL-6 e TNF podem refletir o status do CRC, sendo que níveis aumentados dessas citocinas foram associados ao pior prognóstico (Galizia *et al.*, 2002; Chung e Chang, 2003; Grivennikov e Karin, 2008; Balkwill, 2009). Os achados desse trabalho, no entanto, não mostraram ação da DAR na expressão sérica de citocinas.

Ademais, a ativação da via IKK/NF- κ B é fortemente correlacionada com carcinogênese associada a colite (Pikarsky *et al.*, 2004), o que também pode justificar os efeitos anti-carcinogênicos da DAR demonstrados nesse estudo, uma vez que encontrou-se redução na ativação de IKK, bem como de JNK. Em concordância com esses achados, o tratamento com infliximab, o qual neutraliza TNF, mostrou inibir a ativação colônica de IKK e JNK promovendo então redução da quantidade de adenomas no cólon e redução no crescimento de câncer de cólon em modelos de xenoenxerto (Flores *et al.*, 2012).

Os resultados desse estudo também evidenciaram redução da ativação da via AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) no cólon, mas não no tumor dos animais tratados com DAR. Tal fato também foi verificado em estudo de imuno-histoquímica em adenomas e CCRs humanos no qual confirmou-se que ativação de mTOR ocorre como um evento precoce na tumorigênese e participa na progressão de células normais para um fenótipo neoplásico, ressaltando assim a importância do uso drogas que tenham ação não somente sobre a via de sinalização inflamatória, mas também sobre a via de crescimento tumoral da mTOR, afim de evitar a progressão do CRC (Zhang *et al.*, 2009).

Meta-análise do uso da DAR nas doenças articulares descreve a diarreia como o efeito colateral mais prevalente, sendo o risco relativo 3,5 vezes maior no grupo tratado

com DAR comparado ao placebo (Fidelix, Macedo, Maxwell e Fernandes Moça Trevisani, 2014). Contraditoriamente, os resultados evidenciaram redução no número de episódios de diarreia nos animais tratados com DAR. Tal fato, juntamente com a redução do sangramento retal nesses animais tratados com DAR possivelmente tenha influenciado o aumento da sobrevida deste grupo comparado ao grupo CTL.

Os resultados desse estudo não evidenciaram ação da DAR na apoptose celular. Em concordância com esse achado Greten *et al.* (2004) encontrou que a deleção de IKK β em células mielóides foi capaz de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias e o tamanho tumoral, embora não tenha influenciado a morte celular. Em contrapartida, 5-ASA, mostrou efeito protetor contra o CRC pela promoção da apoptose celular (Tian *et al.*, 2011).

Consistente, com os achados do efeito da DAR na modulação da expressão de mediadores inflamatórios no microambiente tumoral, esse trabalho não encontrou efeito inibitório no desenvolvimento de tumores não modulados pela inflamação, como demonstrado nos modelos de xenoinxertos com B16 e HT-29. Ressaltando que os benefícios encontrados pelo uso da DAR estão relacionados a sua ação na via inflamatória.

Embora o uso de antagonistas de TNF seja uma estratégia eficaz e largamente utilizada no manejo das DII, um relevante número de pacientes apresenta resistência ao tratamento, podendo então evoluir para a apresentação de danos irreversíveis ao cólon como o CRC (Baumgart e Sandborn, 2007; Ordás, Feagan e Sandborn, 2011). Considerando os resultados aqui apresentados e os elevados níveis de IL-1 β no cólon de pacientes com DII, o uso da DAR em ensaios clínicos para DII merece maior atenção.

6 CONCLUSÃO

1. O tratamento com DAR reduziu o número e tamanho de tumores de cólon induzidos por AOM + DSS em animais.
2. A DAR atenuou o processo inflamatório no cólon.
3. Ocorreram menos episódios de sangramento retal e diarreia nos animais tratados com DAR.
4. Os animais tratados com DAR apresentaram maior sobrevida.
5. O tratamento com DAR não modulou a expressão sérica de citocinas pró-inflamatórias.
6. O tratamento com DAR promoveu a redução da expressão gênica de IL-1 β e da atividade de mediadores inflamatórios, como IKK e JNK no cólon dos camundongos.
7. A DAR não exerceu efeitos nos processos de proliferação e morte celular, bem como na atividade dos mediadores de crescimento tumoral, como AKT e P70S6K no tecido tumoral.
8. A DAR não apresentou ação sobre o crescimento de tumores primariamente não modulados pela inflamação, como evidenciado nos modelos de xenoenxerto com B16 e HT-29.

Em resumo, os resultados apresentados neste trabalho, indicam que a DAR promoveu a atenuação do processo inflamatório no cólon mediante redução da expressão gênica de IL-1 β e consequentemente reduziu a ocorrência de CAC em animais. O que nos leva a sugerir a DAR como um candidato em potencial para a prevenção do CAC.

7 REFERÊNCIAS

ALLAVENA, P. et al. Chemokines in cancer related inflammation. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 5, p. 664-73, Mar 2011. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21134366> >.

ARBER, N. et al. Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. **N Engl J Med**, v. 355, n. 9, p. 885-95, Aug 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943401> >.

ARBER, N.; LEVIN, B. Chemoprevention of colorectal neoplasia: the potential for personalized medicine. **Gastroenterology**, v. 134, n. 4, p. 1224-37, Apr 2008. ISSN 1528-0012 (Electronic)

0016-5085 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18395100 >.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361-71, May 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343034> >.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-45, Feb 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229684> >.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1641-57, May 2007. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499606> >.

BECKER, C. et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 491-501, Oct 2004. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485627> >.

BERTAGNOLLI, M. M. et al. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. **N Engl J Med**, v. 355, n. 9, p. 873-84, Aug 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943400> >.

BIANCHI PORRO, G. et al. [Endoscopic evaluation of the effects of diacerhein and naproxen on the gastroduodenal mucosa]. **Minerva Med**, v. 78, n. 6, p. 411-3, Mar 1987. ISSN 0026-4806. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3561852> >.

BROMBERG, J.; WANG, T. C. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. **Cancer Cell**, v. 15, n. 2, p. 79-80, Feb 2009. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185839> >.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579-91, Aug 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286738> >.

CHUNG, Y. C.; CHANG, Y. F. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. **J Surg Oncol**, v. 83, n. 4, p. 222-6, Aug 2003. ISSN 0022-4790. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12884234> >.

COLLINS, R. H.; FELDMAN, M.; FORDTRAN, J. S. Colon cancer, dysplasia, and surveillance in patients with ulcerative colitis. A critical review. **N Engl J Med**, v. 316, n. 26, p. 1654-8, Jun 1987. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3295551> >.

COOPER, H. S. et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. **Lab Invest**, v. 69, n. 2, p. 238-49, Aug 1993. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8350599> >.

DE ROBERTIS, M. et al. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. **J Carcinog**, v. 10, p. 9, 2011. ISSN 1477-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21483655> >.

DEMARIA, S. et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. **J Immunother**, v. 33, n. 4, p. 335-51, May 2010. ISSN 1537-4513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20386472> >.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935-50, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303881> >.

DUBOIS, R. N.; SMALLEY, W. E. Cyclooxygenase, NSAIDs, and colorectal cancer. **J Gastroenterol**, v. 31, n. 6, p. 898-906, Dec 1996. ISSN 0944-1174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027660> >.

EADEN, J. A.; ABRAMS, K. R.; MAYBERRY, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**, v. 48, n. 4, p. 526-35, Apr 2001. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11247898> >.

FIDELIX, T. S. et al. Diacerein for osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, p. CD005117, 2014. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24515444> >.

FLORES, M. B. et al. Obesity-induced increase in tumor necrosis factor- α leads to development of colon cancer in mice. **Gastroenterology**, v. 143, n. 3, p. 741-53.e1-4, Sep 2012. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22677195> >.

GALIZIA, G. et al. Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. **Clin Immunol**, v. 102, n. 2, p. 169-78, Feb 2002. ISSN 1521-6616. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846459> >.

GILLEN, C. D. et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. **Gut**, v. 35, n. 11, p. 1590-2, Nov 1994. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7828978> >.

GRETEN, F. R. et al. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 285-96, Aug 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294155> >.

GRIVENNIKOV, S.; KARIN, M. Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? **Cancer Cell**, v. 13, n. 1, p. 7-9, Jan 2008. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18167335> >.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303878> >.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. **Curr Opin Genet Dev**, v. 20, n. 1, p. 65-71, Feb 2010. ISSN 1879-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036794> >.

GUO, L. et al. MicroRNAs, TGF- β signaling, and the inflammatory microenvironment in cancer. **Tumour Biol**, Nov 2015. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26563372> >.

HALF, E.; ARBER, N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. **Expert Opin Pharmacother**, v. 10, n. 2, p. 211-9, Feb 2009. ISSN 1744-7666. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236194> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

JESS, T.; RUNGOE, C.; PEYRIN-BIROULET, L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 6, p. 639-45, Jun 2012. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22289873> >.

KARIN, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 431-6, May 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724054> >.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 10, p. 749-59, Oct 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175180> >.

KELLER, J. J.; GIARDIELLO, F. M. Chemoprevention strategies using NSAIDs and COX-2 inhibitors. **Cancer Biol Ther**, v. 2, n. 4 Suppl 1, p. S140-9, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 1538-4047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508092> >.

KRAUS, S.; ARBER, N. Inflammation and colorectal cancer. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 4, p. 405-10, Aug 2009. ISSN 1471-4973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19589728> >.

KULAYLAT, M. N.; DAYTON, M. T. Ulcerative colitis and cancer. **J Surg Oncol**, v. 101, n. 8, p. 706-12, Jun 2010. ISSN 1096-9098. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512947> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LANAS, A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase inhibition in the gastrointestinal tract: a trip from peptic ulcer to colon cancer. **Am J Med Sci**, v. 338, n. 2, p. 96-106, Aug 2009. ISSN 0002-9629. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680014> >.

LEE, H. J. et al. The role of chronic inflammation in the development of gastrointestinal cancers: reviewing cancer prevention with natural anti-inflammatory intervention. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, p. 1-11, Nov 2015. ISSN 1747-4132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26524133> >.

LENNARD-JONES, J. E. Cancer risk in ulcerative colitis: surveillance or surgery. **Br J Surg**, v. 72 Suppl, p. S84-6, Sep 1985. ISSN 0007-1323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3899269> >.

LI, X. et al. Identification of gene expression changes from colitis to CRC in the mouse CAC model. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95347, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743346> >.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, Jul 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650914> >.

MARSZALEK, A. et al. Impact of COX-2, IL-1 β , TNF- α , IL-4 and IL-10 on the process of carcinogenesis in the large bowel. **Pol J Pathol**, v. 63, n. 4, p. 221-7, Dec 2012. ISSN 1233-9687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359190> >.

MENDES, A. F. et al. Diacerhein and rhein prevent interleukin-1beta-induced nuclear factor-kappaB activation by inhibiting the degradation of inhibitor kappaB-alpha. **Pharmacol Toxicol**, v. 91, n. 1, p. 22-8, Jul 2002. ISSN 0901-9928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193257> >.

MOLDOVAN, F. et al. Diacerhein and rhein reduce the ICE-induced IL-1beta and IL-18 activation in human osteoarthritic cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 8, n. 3, p. 186-96, May 2000. ISSN 1063-4584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806046> >.

MOORE, A. R. et al. Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 6, n. 1, p. 19-23, Jan 1998. ISSN 1063-4584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9616435> >.

NICOLAS, P. et al. Clinical pharmacokinetics of diacerein. **Clin Pharmacokinet**, v. 35, n. 5, p. 347-59, Nov 1998. ISSN 0312-5963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9839088> >.

NING, C. et al. Complement activation promotes colitis-associated carcinogenesis through activating intestinal IL-1 β /IL-17A axis. **Mucosal Immunol**, v. 8, n. 6, p. 1275-84, Nov 2015. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25736459> >.

ORDÁS, I.; FEAGAN, B. G.; SANDBORN, W. J. Early use of immunosuppressives or TNF antagonists for the treatment of Crohn's disease: time for a change. **Gut**, v. 60, n. 12, p. 1754-63, Dec 2011. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21997558> >.

OSÓRIO-COSTA, F.; CARVALHEIRA, J. B. C. **TNF- α in obesity-associated colon cancer**. Transl. Gastrointest Cancer. 4: 179-193 p. 2013.

PASIN, J. S. et al. Diacerein decreases TNF-alpha and IL-1beta levels in peritoneal fluid and prevents Baker's yeast-induced fever in young rats. **Inflamm Res**, v. 59, n. 3, p. 189-96, Mar 2010. ISSN 1420-908X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19730987> >.

PELLETIER, J. P. et al. Efficacy and safety of diacerein in osteoarthritis of the knee: a double-blind, placebo-controlled trial. The Diacerein Study Group. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 10, p. 2339-48, Oct 2000. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11037895> >.

PIKARSKY, E. et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 461-6, Sep 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15329734> >.

POPIVANOVA, B. K. et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 2, p. 560-70, Feb 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18219394> >.

RUBIN, D. T. et al. Inflammation is an independent risk factor for colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis: a case-control study. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 11,

n. 12, p. 1601-8.e1-4, Dec 2013. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872237> >.

RUTTER, M. et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 126, n. 2, p. 451-9, Feb 2004. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14762782 >.

SHPITZ, B. et al. Celecoxib and curcumin additively inhibit the growth of colorectal cancer in a rat model. **Digestion**, v. 74, n. 3-4, p. 140-4, 2006. ISSN 1421-9867. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17228149> >.

SPENCER, C. M.; WILDE, M. I. Diacerein. **Drugs**, v. 53, n. 1, p. 98-106; discussion 107-8, Jan 1997. ISSN 0012-6667. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010651> >.

TAKAI, A. et al. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. **Oncogene**, v. 28, n. 4, p. 469-78, Jan 2009. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997814> >.

TAMURA, T.; OHMORI, K. Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis. **Eur J Pharmacol**, v. 419, n. 2-3, p. 269-74, May 2001. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426851> >.

TENESA, A.; DUNLOP, M. G. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 6, p. 353-8, Jun 2009. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19434079> >.

TIAN, Y. et al. Aspirin promotes apoptosis in a murine model of colorectal cancer by mechanisms involving downregulation of IL-6-STAT3 signaling pathway. **Int J Colorectal Dis**, v. 26, n. 1, p. 13-22, Jan 2011. ISSN 1432-1262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20886344> >.

TOBAR, N. et al. Diacerhein improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice on a high-fat diet. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4080-93, Nov 2011. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21896669 >.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439> >.

ULLMAN, T. et al. Progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: effect of mesalamine. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 11, p. 1225-30; quiz 1177, Nov 2008. ISSN 1542-7714 (Electronic) 1542-3565 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18848502 >.

VELAYOS, F. S.; TERDIMAN, J. P.; WALSH, J. M. Effect of 5-aminosalicylate use on colorectal cancer and dysplasia risk: a systematic review and metaanalysis of observational studies. **Am J Gastroenterol**, v. 100, n. 6, p. 1345-53, Jun 2005. ISSN 0002-9270 (Print) 0002-9270 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15929768 >.

WEST, N. R. et al. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 10, p. 615-29, Oct 2015. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358393> >.

YAMAMOTO, Y. et al. Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. **J Biol Chem**, v. 274, n. 38, p. 27307-14, Sep 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480951> >.

YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 1, p. 41-51, Jan 2007. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186030> >.

ZHANG, Y. J. et al. mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. **Ann Surg Oncol**, v. 16, n. 9, p. 2617-28, Sep 2009. ISSN 1534-4681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517193> >.

8 ANEXO 1



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Papel da Diacereína no Desenvolvimento de Tumor de Cólon em animais" (protocolo nº 3350-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira / Daiane Sofia de M. Paulino, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de abril de 2014.

Campinas, 07 de abril de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima-Alonso
Secretária Executiva

9 ANEXO 2

Diacerein treatment prevents colitis-associated cancer in mice

**Daiane S M Paulino¹, Maria Carolina S. Mendes¹, Juliana Alves Camargo¹, José B C
Carvalho¹**

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas/São Paulo, Brazil.

Running title: Diacerein treatment prevents CAC in mice

Corresponding author: *José BarretoCampello Carvalho, Department of Internal Medicine, FCM-State University of Campinas (UNICAMP) - MA: 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Email: carvalho@me.com*

ABSTRACT

Inflammation is a well-established enabling factor for cancer development and provides a framework for the high prevalence of colon cancer in individuals with inflammatory bowel disease. Despite the epidemiological importance of inflammation-mediated colon cancer, the role of anti-inflammatory drugs in the prevention of colitis-associated cancer (CAC) is only partially understood. The study presented herein evaluates the role of diacerein (DAR), an anti-inflammatory drug that mainly acts through inhibition of IL-1 β expression, in CAC development. DAR treatment reduced colon inflammation as well as the number and size of tumors in AOM+DSS-treated animals. Accordingly, DAR treatment was associated with reduced intracellular signals of inflammation (IKK and JNK phosphorylation) in colon and tumor tissues. Conversely, cancer xenograft growth rates were not changed by DAR administration. DAR treatment also did not affect cell proliferation or apoptosis of colon cancer and was not associated with changes in the activity of proteins involved in proliferation, such as Akt and p70S6k. Together, these data suggest that DAR-mediated IL-1 β suppression inhibits inflammation-induced colon cancer promotion and highlights DAR as a potential candidate for the chemoprevention of CAC.

Key words: Colitis, colon cancer, inflammatory bowel disease, IKK, IL-1 β .

INTRODUCTION

Over the past few decades, inflammation has emerged as an important enabling factor for cancer development (Terzic *et al.*, 2010; Hanahan e Weinberg, 2011; Ullman e Itzkowitz, 2011). Although the mechanisms that link inflammation to carcinogenesis remains poorly understood, inflammation favors all stages of tumorigenesis by exerting direct effects on tumor cell proliferation, survival, metastasis and angiogenesis (Kraus e Arber, 2009; Allavena *et al.*, 2011; Osório-Costa e Carvalheira, 2013). Accordingly, the most prevalent inflammatory bowel diseases (IBD), ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), significantly increase the risk for future development of colorectal cancer (CRC) (Gillen *et al.*, 1994; Eaden, Abrams e Mayberry, 2001; Kulaylat e Dayton, 2010).

Chemically induced colitis studies have led to the identification of pro-inflammatory cytokines as key elements in the pathogenesis of both colitis and colitis-associated cancer (CAC) (West *et al.*, 2015). These studies disclosed a positive correlation between increased serum levels of IL-6 and the incidence of CRC (Bromberg e Wang, 2009). CRC incidence is reduced in mice lacking the TNF receptor, p55 (TNF-Rp55 knockout) treated with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS) (Popivanova *et al.*, 2008). In consonance with these results, IL-1 β is increased in a DSS-AOM CAC model, and the administration of an IL-1 receptor antagonist prevented cancer (Cominelli *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014). Moreover, genetic ablation of IKK β , an intracellular molecule that activates NF κ B by pro-inflammatory cytokines, attenuates the development of CAC (Greten *et al.*, 2004). Despite the progress in this field, the effect of anti-inflammatory drugs in CAC chemoprevention is not entirely clear (Arber e Levin, 2008).

Although some studies reported that IBD canonical anti-inflammatory treatment with 5-aminosalicylates (5-ASA) reduces the risk of developing CRC (Velayos, Terdiman e Walsh, 2005), other results are conflicting (Rutter *et al.*, 2004; Ullman *et al.*, 2008). Interestingly, compounds of a diverse nature with anti-inflammatory properties were described to have chemopreventive effects in animal models of CAC carcinogenesis (Shimizu *et al.*, 2008; Shirakami *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2009; Shirakami *et al.*, 2014). Furthermore, antibody-mediated TNF neutralization resulted in the reduction of tumor incidence and multiplicity (Kim *et al.*, 2010). However, the potential role of pharmacological IL-1 β inhibitors in the development of CAC was not fully explored.

Diacerein (1,8-diacetoxi-9, 10-dioxo-dihydroanthracene-3-carboxylic acid) is an NSAID first described in 1980 (Pomarelli *et al.*, 1980). Mechanistically, diacerein and its derived metabolite rhein act mainly by suppressing IL-1 β expression (Spencer e Wilde, 1997). However, other effects have been described including reducing serum levels of IL-12 and TNF- α , inhibition of chemotaxis and neutrophil phagocytosis (Spencer e Wilde, 1997; Malaguti *et al.*, 2008).

Herein, we report that diacerein treatment suppressed colitis and CAC in animals treated with AOM+DSS. These results reveal diacerein as a potential candidate for the treatment of IBD as well as for the chemoprevention of CRC associated with IBD.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male C57BL/6, NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib, and Swiss mice aged 8–10 weeks old were maintained at the Animal Breeding Center of the State University of Campinas (UNICAMP) (Campinas, São Paulo, Brazil) under pathogen-free conditions in a 12h/12h light/dark cycle and a temperature-controlled environment. Mice were fed with a standard diet (AIN-93) and received water *ad libitum*. All procedures involving animals were approved by the local animal ethics committee of UNICAMP (Protocol n° 3350-1).

Treatments

Diacerein was provided by TRB-Pharma (Campinas, SP, Brazil), and it was diluted in 0.01 M PBS. The group treated with diacerein (DAR) received a dose of 50 mg/kg/day by gavage during all experiments, while the control group received vehicle (PBS).

Tumor xenograft models

Skin cancer cells (melanoma - B16) and colon cancer cells (HT-29) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Philadelphia, PA, USA). These cells were cultured in appropriate medium according to ATCC recommendations, with the addition of penicillin/streptomycin and were maintained at 37 °C in a CO₂ incubator. These cells (1×10^6) were inoculated subcutaneously (SC) into the mice dorsal region. Melanoma cancer cells (B16) were inoculated in C57BL/6, while colon cancer cells (HT-29) were inoculated in NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib.

Tumor volume (V) was calculated daily using the formula ($V = W \times L [(W + L)/2] \times 0.52$). The width (W) and length (L) of the tumor were measured with a caliper. After tumors reached 50 mm³, the animals were randomly divided into two groups (CTL and DAR) and treated for 13 days in B16 xenograft and for 23 days in HT-29 xenograft. The animals' weights were recorded daily.

Colon cancer induction model

Azoxymethane (AOM, 12.5 mg/kg) was injected intraperitoneally in Swiss mice. After one week, the animals received 2.5% dextran sodium sulfate (DSS) in water for five days. DSS treatment was repeated every month for a total of three cycles (Popivanova *et al.*, 2008). The mice were sacrificed ten days after the last DSS treatment. Concurrently with AOM administration, the animals were randomly divided into two groups (CTL and DAR). The weight of the animals was measured weekly. The presence of anal bleeding and diarrhea of the animals were recorded daily.

Western blotting

Resected tissue were immediately homogenized in buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Laemmli solution containing DTT (100 mM) was added to the sample, which was heated at 100 °C for 5 minutes (Laemmli, 1970). Equivalent amounts of total extracts were subjected to 8–10% SDS-PAGE. A Bio-Rad instrument (Richmond, CA) was used to transfer the proteins from gel to nitrocellulose membranes. Subsequently, the membranes were incubated in blocking and antibodies solutions. The antibodies used were anti-phospho-JNK Thr183/Tyr185 (Santa Cruz Biotechnology, SC-12882-R) and anti-phospho-IKK Ser180/Ser181 (Santa Cruz Biotechnology, SC-23470-R), anti-phospho-AKT Ser473 (Cell Signaling Technology, Cell-9271), anti-phospho-p70S6K Thr389 (Cell Signaling Technology, Cell-9205), and anti- β -Tubulin (Cell Signaling Technology, Cell-2146).

The membranes were washed three times in Tris-buffered saline for 10 minutes, incubated with peroxidase-labeled anti-mouse or anti-rabbit IgG antibodies diluted in blocking buffer for 2 h, and then washed again. These membranes were exposed to a chemiluminescence solution (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) under constant agitation for approximately three minutes, and then they were subsequently revealed in ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Tumoral histopathology

The colons of Swiss mice were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h, embedded in paraffin and cut in 5 μ m thickness sections. Histopathological analysis was performed on paraffin-embedded sections after hematoxylin and eosin (H&E) staining. Colon

inflammation score determination was performed as previously described (Cooper *et al.*, 1993).

Immunohistochemistry

The slides of colon tissue were deparaffinized, permeabilized with 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) and heated 2 times (with 2 minutes of break between each heating) for 7 minutes using a domestic microwave oven. After heating, the slides were cooled to ambient temperature. The blocking was carried out with endogenous peroxidase (1% H₂O₂ in methanol) for 15 minutes, followed by proteinase K treatment (20 mg/ml) for 30 minutes. The slides were subsequently incubated with primary monoclonal mouse anti-human Ki-67 clone MIB-1 (Dako, diluted 1:1000) at 4 °C overnight. Finally, the slides were incubated for 30 minutes with avidin-biotin complex (LSAB+ Kit, Dako Cytomation) followed by the addition of diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma Aldrich) as a chromogenic substrate. After hematoxylin staining and dehydration, the slides were mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). A commercial apoptosis detection kit (Roche) was used for the detection of Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) according to the recommendations of the manufacturer. Documentation and analysis of immunohistochemistry results were performed using a Leica FW4500 B microscope.

Serum analysis

The serum cytokine profile (TNF, IL-1 β and IL-6) of animals subjected to colon cancer induction was measured using a commercial ELISA kit (Millipore, St. Charles, MO, USA).

RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

The expression levels of TNF- α , interleukin (IL)-1 β and interleukin (IL)-6 genes in the colonic mucosa of Swiss mice were determined by quantitative real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis. The total RNA was isolated according to manufacturer recommendations and then reverse transcribed into c-DNA by using the

Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). The TaqMan™ system (Applied Biosystems) was used for RT-PCR reactions. The specific primers used for gene amplification were TNF- α (Mn00443260), IL-1 β (Mn00434228) and IL-6 (Mn00446190). The β -actin (BAC) gene (TaqMan™ – Applied Biosystems) was used for normalization of genic expression. The programs QuantStudio™ 7 Software v1.0 (Applied Biosystems) and DataAssist™ Software v3.01 (Life Technologies) were used for data analyses.

Statistical analyses

The results were presented as the mean $\pm$ SEM. Differences between groups were analyzed by two-tailed student's t-tests, and the level of significance adopted was a p-value of less than 0.05. The statistical methodology employed for the analysis of Kaplan-Meier curves was an unstratified log-rank test. Multiple measures ANOVA was used to compare treatment effectiveness for rectal bleeding and diarrhea. The level of significance adopted was a p-value of less than 0.05. Data analysis was conducted using Stata (version 12; Statacorp, College Station, TX) and GraphPad Prism, version 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

Diacerein (DAR) prevents inflammation-induced colon carcinogenesis

To determine whether pharmacological reduction of IL-1 β treatment prevents CAC, we evaluated the effect of DAR administration using the DSS-AOM model. There were fewer and smaller tumors in the DAR-treated mice (CTL = 9.86 ± 1.53 g; DAR = 5.58 ± 0.96 g; $p = 0.016$) than in the control mice (CTL = 3.38 ± 0.28 mm; DAR = 1.77 ± 0.17 mm; $p < 0.001$) (Figs. 1A–B). In contrast, DAR treatment did not change tumor incidence (CTL = 80%; DAR = 80.9%; $p = 0.94$).

Next, we hypothesized that DAR anti-inflammatory action could directly attenuate colon cancer growth. We addressed this hypothesis using xenograft model experiments, in which cancer development is not primarily dependent on inflammation. There were no changes in B16 tumor growth in animals treated with vehicle or DAR, which does not support our primary hypothesis. Similarly, SCID mice inoculated with HT-29, whether DAR treated or not, presented similar growth rates (Figs. 1C–D).

DAR treatment suppresses chemical induced colitis

The median time to first rectal bleeding episode analysis showed no difference between the two arms, as shown in Figure 2A. The median time to a first rectal bleeding episode was 23.5 days (95% CI, 23 to 46 days) for DAR-treated mice and 26 days (95% CI, 8 to 46 days) for control animals. In contrast, DAR treatment was associated with a reduced intensity of rectal bleeding as measured by the number of bleeding episodes over time (Fig. 2B). The time to the first diarrhea episode was prolonged with DAR versus control (median, not reached vs 28 days, respectively; $p < 0.01$ by log rank test) (Fig. 2C). A previous meta-analysis showed that DAR treatment was associated with a relative risk increase of 3.5 in diarrhea (Fidelix, Macedo, Maxwell e Fernandes Moca Trevisani, 2014). However, diacerein treatment reduced the number of diarrhea episodes in this study, as shown in Figure 2D. Accordingly, the analysis of overall survival showed that DAR treatment resulted in a reduction in the risk of death compared with no treatment ($p=0.03$ by log rank test) (Figure 2E). Changes in body weight were not detected after treatment (CTL = 2.81 ± 0.49 g; DAR = 3.27 ± 0.53 g, $p = 0.53$) (Fig. 2F).

The analysis of mouse colon inflammatory index showed a significant decrease in intestinal inflammation of animals treated with DAR compared to CTL (Fig. 3A). Next,

we measured the expression levels of the pro-inflammatory cytokines TNF, IL-1 β and IL-6 in colonic mucosa. There was a reduction in IL-1 β expression in mice treated with DAR, but no differences in TNF and IL-6 levels (Fig. 3B). We did not observe a reduction in serum cytokine levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 in animals treated with DAR compared to vehicle (Fig. 3C). Consistent with these results, DAR treatment inhibited the activation of proteins involved in inflammation in both colon and colon cancer of Swiss mice. Figure 3D shows a dramatic reduction of IKK and JNK phosphorylation in colonic tissues and a smaller inhibition in colon cancer.

DAR treatment does not induce apoptosis or modulate cell proliferation

Support for the hypothesis that DAR anti-cancer effects are mainly mediated by inflammation and not by direct cancer cell effects, come from the proliferation and apoptosis assays. Our results show that DAR treatment did not play a significant role in the apoptosis of tumor cells, as observed by TUNEL staining (CTL = $63.94 \pm 3.98\%$; DAR = $69.68 \pm 2.28\%$; $p = 0.24$; $n = 5$; five fields per colon section). Likewise, treatment with DAR did not affect cell proliferation, here measured by the percentage of cells stained with Ki-67 (CTL = $16.92 \pm 1.05\%$; DAR = $17.16 \pm 1.97\%$; $n = 5$; five fields per colon section) (Figs 4A–B). Accordingly, DAR treatment inhibited the activation of proteins involved in proliferation in the colon but not in colon cancer. Figure 4C shows a reduction of Akt and p70S6K phosphorylation in colonic tissues, whereas there is no change in the activation of these proteins in colon cancer.

DISCUSSION

Colon cancer is a daunting and disastrous consequence of colon chronic inflammation. Despite a recent meta-analysis showing that ulcerative colitis is associated with a 2.4-fold increased risk of CAC, the role of anti-inflammatory drugs as chemopreventive agents remains unclear (Arber e Levin, 2008; Jess, Rungoe e Peyrin-Biroulet, 2012). IL-1 β , a dominant mediator of the distinct animal colitis model, occurs in abundant levels in patients with ulcerative colitis (Rachmilewitz *et al.*, 1989; Mahida *et al.*, 1991; Reinecker *et al.*, 1993; Mcalindon, Hawkey e Mahida, 1998). Diacerein is an old drug commonly used for the treatment of osteoarthritis (Fidelix, Macedo, Maxwell e Fernandes Moca Trevisani, 2014); however, its effect of lowering IL-1 β levels for CAC control is unknown. In the present study, we determined that DAR is sufficient to prevent colon cancer in the AOM-DSS model. This anti-cancer effect was a result of colitis suppression. More specifically, diacerein reduced colonic IL-1 β expression that coincided with a reduction in the activation of the pro-inflammatory intracellular signal mediators JNK and IKK, which resulted in decreased proliferation of colonic tissues.

Diacerein treatment specifically reduced IL-1 β expression and IKK activation in the colons of AOM-DSS treated mice, with no detectable change in the expression of other key pro-inflammatory cytokines such as TNF and IL-6. Indeed, previous work reported that the specific blockage of the IL-1 β signaling pathway attenuated DSS-induced bowel inflammation (Cominelli *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014). Given that the activation of the IKK/NF- κ B signaling pathway is strongly correlated with CAC carcinogenesis (Greten *et al.*, 2004; Pikarsky *et al.*, 2004), it is possible that the DAR-mediated decrease in inflammation is due to its effect on this signaling pathway. Moreover, treatment with infliximab, which neutralizes TNF, was sufficient to inhibit colonic IKK activation and reduce the number of tumors in the AOM-DSS model (Flores *et al.*, 2012). Thus, the activation of IKK in CAC is not only required for the development of intestinal inflammation but may also be a biomarker of anti-inflammatory effectiveness to prevent CAC development.

Aberrant activation of mTOR signaling has long been associated with colon cancer development (Aoki *et al.*, 2003; Shao, Evers e Sheng, 2004); however, it was not until recently that it was recognized as a common event during the course of IBD that is

key for CAC carcinogenesis (Deng *et al.*, 2010; Thiem *et al.*, 2013). Consistent with previous studies showing that the AKT/mTOR signaling pathway is activated by IL-1 β (Reddy, Huang e Liao, 1997), our data shows that DAR inhibits AKT and p70S6K phosphorylation in colonic tissues. Thus, our data extend these previous studies suggesting that IL-1 β links inflammation to proliferation, since it was enough to mediate AKT/mTOR activation, in the early steps of CAC carcinogenesis.

An important distinction between the pathophysiological contexts of CAC and sporadic colorectal cancer is the role of inflammation in the initial steps of carcinogenesis. It is implausible that inflammation promotes tumor initiation in sporadic colorectal cancer, while inflammation precedes CAC by triggering DNA damage and suppressing mismatch of repair enzymes, therefore supporting tumor initiation (Terzic *et al.*, 2010). Consistent with this concept, our data show that DAR did not change the activation of AKT/mTOR signaling in established colon tumors, and DAR did not affect cancer cell proliferation and apoptosis rates. Consistent with these findings, the sole deletion of IKK β in myeloid cells did not influence cancer cell death in the AOM-DSS model (Greten *et al.*, 2004). Moreover, DAR treatment does not change tumor growth rates of B16 and HT-29 xenografts, which do not primarily involve inflammation, implying that the DAR anti-cancer effect involves the tumor microenvironment.

Although neutralizing TNF is an effective approach and changed the history of IBD, a large proportion of patients still relapse or present persistent disease, which can lead to irreversible colon damage as well as increased risk to develop CAC (Baumgart e Sandborn, 2007; Melmed e Targan, 2010; Ordas, Feagan e Sandborn, 2011). The results presented herein indicate that diacerein-mediated reduction in IL-1 β prevents both colitis and the development of colorectal cancer. Therefore, DAR is an attractive candidate to be evaluated in clinical trials considering that a new indication for drugs with a known safety profile has the potential to short-cut and reduce the costs of translational research and the significantly increased IL-1 β levels in the colons of IBD patients.

Acknowledgments

This work was financed by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil - 07607-8/2013) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, 306821/2010-9). The research funding agencies had no role in any part of the study design, data acquisition or manuscript preparation.

We thank Mr. Luiz Janeri, Josimo Pinheiro, Sandra Brambilla, Dioze Guadagnini, Andrey Santos of the State University of Campinas, Brazil for technical assistance.

Disclosure of potential conflicts of interest

Daiane Paulino, Maria Carolina Mendes, Juliana Camargo and José Carvalheira declare that they have no conflict of interest.

Authors' contributions

The experiments were performed by D.S.M.P., M.C.S.M. and J.A.C. The experimental design was performed by D.S.M.P., M.C.S.M., J.A.C. and J.B.C.C. The analysis and interpretation of data were carried out by D.S.M.P. and J.B.C.C. The manuscript was written by D.S.M.P. and J.B.C.C; and it was revised by J.B.C.C.

J.B.C.C. was the advisor in this study.

Abbreviations

AKT/PKB, Protein Kinase B; CAC, colitis-associated cancer; CRC, colorectal cancer; DAR, diacerhein; IBD, inflammatory bowel disease; IKK, inhibitor of I κ B Kinase; IL-1 β , interleukin 1 β ; IL-6, interleukin 6; JNK, c-Jun N-terminal kinase; p70S6K1, 70kDa S6 Kinase 1; TNF, tumor necrosis factor.

REFERENCES

ALLAVENA, P. et al. Chemokines in cancer related inflammation. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 5, p. 664-73, Mar 2011. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21134366> >.

AOKI, K. et al. Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in Apc+/Delta716 Cdx2+/- compound mutant mice. **Nat Genet**, v. 35, n. 4, p. 323-30, Dec 2003. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14625550 >.

ARBER, N. et al. Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. **N Engl J Med**, v. 355, n. 9, p. 885-95, Aug 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943401> >.

ARBER, N.; LEVIN, B. Chemoprevention of colorectal neoplasia: the potential for personalized medicine. **Gastroenterology**, v. 134, n. 4, p. 1224-37, Apr 2008. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395100> >.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361-71, May 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343034> >.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-45, Feb 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229684> >.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1641-57, May 12 2007. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17499606 >.

BECKER, C. et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 491-501, Oct 2004. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485627> >.

BERTAGNOLLI, M. M. et al. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. **N Engl J Med**, v. 355, n. 9, p. 873-84, Aug 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943400> >.

BIANCHI PORRO, G. et al. [Endoscopic evaluation of the effects of diacerhein and naproxen on the gastroduodenal mucosa]. **Minerva Med**, v. 78, n. 6, p. 411-3, Mar 1987. ISSN 0026-4806. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3561852> >.

BROMBERG, J.; WANG, T. C. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. **Cancer Cell**, v. 15, n. 2, p. 79-80, Feb 2009. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185839> >.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579-91, Aug 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286738> >.

CHUNG, Y. C.; CHANG, Y. F. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. **J Surg Oncol**, v. 83, n. 4, p. 222-6, Aug 2003. ISSN 0022-4790. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12884234> >.

COLLINS, R. H.; FELDMAN, M.; FORDTRAN, J. S. Colon cancer, dysplasia, and surveillance in patients with ulcerative colitis. A critical review. **N Engl J Med**, v. 316,

n. 26, p. 1654-8, Jun 1987. ISSN 0028-4793. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3295551> >.

COMINELLI, F. et al. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. **Gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 65-71, Jul 1992. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1535326 >.

COOPER, H. S. et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. **Lab Invest**, v. 69, n. 2, p. 238-49, Aug 1993. ISSN 0023-6837. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8350599> >.

DE ROBERTIS, M. et al. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. **J Carcinog**, v. 10, p. 9, 2011. ISSN 1477-3163. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21483655> >.

DEMARIA, S. et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. **J Immunother**, v. 33, n. 4, p. 335-51, May 2010. ISSN 1537-4513. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20386472> >.

DENG, L. et al. A novel mouse model of inflammatory bowel disease links mammalian target of rapamycin-dependent hyperproliferation of colonic epithelium to inflammation-associated tumorigenesis. **Am J Pathol**, v. 176, n. 2, p. 952-67, Feb 2010. ISSN 1525-2191 (Electronic) 0002-9440 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20042677 >.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935-50, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303881> >.

DUBOIS, R. N.; SMALLEY, W. E. Cyclooxygenase, NSAIDs, and colorectal cancer. **J Gastroenterol**, v. 31, n. 6, p. 898-906, Dec 1996. ISSN 0944-1174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027660> >.

EADEN, J. A.; ABRAMS, K. R.; MAYBERRY, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**, v. 48, n. 4, p. 526-35, Apr 2001. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11247898> >.

FIDELIX, T. S. et al. Diacerein for osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, p. CD005117, 2014. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24515444 >.

_____. Diacerein for osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, p. CD005117, 2014. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24515444> >.

FLORES, M. B. et al. Obesity-induced increase in tumor necrosis factor- α leads to development of colon cancer in mice. **Gastroenterology**, v. 143, n. 3, p. 741-53.e1-4, Sep 2012. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22677195> >.

GALIZIA, G. et al. Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. **Clin Immunol**, v. 102, n. 2, p. 169-78, Feb 2002. ISSN 1521-6616. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846459> >.

GILLEN, C. D. et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. **Gut**, v. 35, n. 11, p. 1590-2, Nov 1994. ISSN 0017-5749 (Print) 0017-5749 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7828978 >.

GRETEN, F. R. et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 285-96, Aug 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294155> >.

GRIVENNIKOV, S.; KARIN, M. Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? **Cancer Cell**, v. 13, n. 1, p. 7-9, Jan 2008. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18167335> >.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303878> >.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. **Curr Opin Genet Dev**, v. 20, n. 1, p. 65-71, Feb 2010. ISSN 1879-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036794> >.

GUO, L. et al. MicroRNAs, TGF- β signaling, and the inflammatory microenvironment in cancer. **Tumour Biol**, Nov 2015. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26563372> >.

HALF, E.; ARBER, N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. **Expert Opin Pharmacother**, v. 10, n. 2, p. 211-9, Feb 2009. ISSN 1744-7666. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236194> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21376230 >.

JESS, T.; RUNGOE, C.; PEYRIN-BIROULET, L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 6, p. 639-45, Jun 2012. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22289873> >.

KARIN, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 431-6, May 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724054> >.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 10, p. 749-59, Oct 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175180> >.

KELLER, J. J.; GIARDIELLO, F. M. Chemoprevention strategies using NSAIDs and COX-2 inhibitors. **Cancer Biol Ther**, v. 2, n. 4 Suppl 1, p. S140-9, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 1538-4047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508092> >.

KIM, Y. J. et al. Prevention of colitis-associated carcinogenesis with infliximab. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 3, n. 10, p. 1314-33, Oct 2010. ISSN 1940-6215 (Electronic) 1940-6215 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20736334 >.

KRAUS, S.; ARBER, N. Inflammation and colorectal cancer. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 4, p. 405-10, Aug 2009. ISSN 1471-4973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19589728> >.

KULAYLAT, M. N.; DAYTON, M. T. Ulcerative colitis and cancer. **J Surg Oncol**, v. 101, n. 8, p. 706-12, Jun 2010. ISSN 1096-9098. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512947> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LANAS, A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase inhibition in the gastrointestinal tract: a trip from peptic ulcer to colon cancer. **Am J Med Sci**, v. 338, n. 2, p. 96-106, Aug 2009. ISSN 0002-9629. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680014> >.

LEE, H. J. et al. The role of chronic inflammation in the development of gastrointestinal cancers: reviewing cancer prevention with natural anti-inflammatory intervention. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, p. 1-11, Nov 2015. ISSN 1747-4132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26524133> >.

LENNARD-JONES, J. E. Cancer risk in ulcerative colitis: surveillance or surgery. **Br J Surg**, v. 72 Suppl, p. S84-6, Sep 1985. ISSN 0007-1323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3899269> >.

LI, X. et al. Identification of gene expression changes from colitis to CRC in the mouse CAC model. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95347, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743346> >.

MAHIDA, Y. R. et al. 5-Aminosalicylic acid is a potent inhibitor of interleukin 1 beta production in organ culture of colonic biopsy specimens from patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 32, n. 1, p. 50-4, Jan 1991. ISSN 0017-5749 (Print) 0017-5749 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1846838 >.

MALAGUTI, C. et al. Diacerhein downregulate proinflammatory cytokines expression and decrease the autoimmune diabetes frequency in nonobese diabetic (NOD) mice. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 6, p. 782-91, Jun 2008. ISSN 1567-5769. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18442781> >.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, Jul 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650914> >.

MARSZALEK, A. et al. Impact of COX-2, IL-1 β , TNF- α , IL-4 and IL-10 on the process of carcinogenesis in the large bowel. **Pol J Pathol**, v. 63, n. 4, p. 221-7, Dec 2012. ISSN 1233-9687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359190> >.

MCALINDON, M. E.; HAWKEY, C. J.; MAHIDA, Y. R. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 42, n. 2, p. 214-9, Feb 1998. ISSN 0017-5749 (Print) 0017-5749 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9536946 >.

MELMED, G. Y.; TARGAN, S. R. Future biologic targets for IBD: potentials and pitfalls. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 2, p. 110-7, Feb 2010. ISSN 1759-5053 (Electronic) 1759-5045 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20134493 >.

MENDES, A. F. et al. Diacerhein and rhein prevent interleukin-1beta-induced nuclear factor-kappaB activation by inhibiting the degradation of inhibitor kappaB-alpha. **Pharmacol Toxicol**, v. 91, n. 1, p. 22-8, Jul 2002. ISSN 0901-9928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193257> >.

MOLDOVAN, F. et al. Diacerhein and rhein reduce the ICE-induced IL-1beta and IL-18 activation in human osteoarthritic cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 8, n. 3, p. 186-96, May 2000. ISSN 1063-4584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806046> >.

MOORE, A. R. et al. Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 6, n. 1, p. 19-23, Jan 1998. ISSN 1063-4584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9616435> >.

NICOLAS, P. et al. Clinical pharmacokinetics of diacerein. **Clin Pharmacokinet**, v. 35, n. 5, p. 347-59, Nov 1998. ISSN 0312-5963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9839088> >.

NING, C. et al. Complement activation promotes colitis-associated carcinogenesis through activating intestinal IL-1 β /IL-17A axis. **Mucosal Immunol**, v. 8, n. 6, p. 1275-84, Nov 2015. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25736459> >.

ORDAS, I.; FEAGAN, B. G.; SANDBORN, W. J. Early use of immunosuppressives or TNF antagonists for the treatment of Crohn's disease: time for a change. **Gut**, v. 60, n. 12, p. 1754-63, Dec 2011. ISSN 1468-3288 (Electronic) 0017-5749 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21997558 >.

ORDÁS, I.; FEAGAN, B. G.; SANDBORN, W. J. Early use of immunosuppressives or TNF antagonists for the treatment of Crohn's disease: time for a change. **Gut**, v. 60, n. 12, p. 1754-63, Dec 2011. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21997558> >.

OSÓRIO-COSTA, F.; CARVALHEIRA, J. B. C. **TNF- α in obesity-associated colon cancer**. Transl. Gastrointest Cancer. 4: 179-193 p. 2013.

PASIN, J. S. et al. Diacerein decreases TNF-alpha and IL-1beta levels in peritoneal fluid and prevents Baker's yeast-induced fever in young rats. **Inflamm Res**, v. 59, n. 3, p. 189-96, Mar 2010. ISSN 1420-908X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19730987> >.

PELLETIER, J. P. et al. Efficacy and safety of diacerein in osteoarthritis of the knee: a double-blind, placebo-controlled trial. The Diacerein Study Group. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 10, p. 2339-48, Oct 2000. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11037895> >.

PIKARSKY, E. et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 461-6, Sep 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15329734> >.

POMARELLI, P. et al. A non steroidal anti-inflammatory drug that stimulates prostaglandin release. **Farmaco Sci**, v. 35, n. 10, p. 836-42, Oct 1980. ISSN 0430-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7450019> >.

POPIVANOVA, B. K. et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 2, p. 560-70, Feb 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18219394> >.

RACHMILEWITZ, D. et al. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, v. 97, n. 2, p. 326-37, Aug 1989. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2545504 >.

REDDY, S. A.; HUANG, J. H.; LIAO, W. S. Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NFkappaB and AP-1 activation. **J Biol Chem**, v. 272, n. 46, p. 29167-73, Nov 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9360994> >.

REINECKER, H. C. et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **Clin Exp Immunol**, v. 94, n. 1, p. 174-81, Oct 1993. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8403503 >.

RUBIN, D. T. et al. Inflammation is an independent risk factor for colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis: a case-control study. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 12, p. 1601-8.e1-4, Dec 2013. ISSN 1542-7714. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872237> >.

RUTTER, M. et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 126, n. 2, p. 451-9, Feb 2004. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14762782 >.

SHAO, J.; EVERS, B. M.; SHENG, H. Roles of phosphatidylinositol 3'-kinase and mammalian target of rapamycin/p70 ribosomal protein S6 kinase in K-Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells. **Cancer Res**, v. 64, n. 1, p. 229-35, Jan 1 2004. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14729629 >.

SHIMIZU, M. et al. Supplementation with branched-chain amino acids inhibits azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 9, p. 3068-75, May 2009. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366832> >.

_____. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 1, n. 4, p. 298-304, Sep 2008. ISSN 1940-6215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19138973> >.

SHIRAKAMI, Y. et al. Chemoprevention of colorectal cancer by targeting obesity-related metabolic abnormalities. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 27, p. 8939-46, Jul 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25083066> >.

_____. EGCG and Polyphenon E attenuate inflammation-related mouse colon carcinogenesis induced by AOM plus DDS. **Mol Med Rep**, v. 1, n. 3, p. 355-61, 2008 May-Jun 2008. ISSN 1791-2997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479417> >.

SHPITZ, B. et al. Celecoxib and curcumin additively inhibit the growth of colorectal cancer in a rat model. **Digestion**, v. 74, n. 3-4, p. 140-4, 2006. ISSN 1421-9867. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17228149> >.

SPENCER, C. M.; WILDE, M. I. Diacerein. **Drugs**, v. 53, n. 1, p. 98-106; discussion 107-8, Jan 1997. ISSN 0012-6667. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010651> >.

TAKAI, A. et al. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. **Oncogene**, v. 28, n. 4, p. 469-78, Jan 2009. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997814> >.

TAMURA, T.; OHMORI, K. Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis. **Eur J Pharmacol**, v. 419, n. 2-3, p. 269-74, May 2001. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426851> >.

TENESA, A.; DUNLOP, M. G. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 6, p. 353-8, Jun 2009. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19434079> >.

TERZIC, J. et al. Inflammation and colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2101-2114 e5, Jun 2010. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20420949 >.

THIEM, S. et al. mTORC1 inhibition restricts inflammation-associated gastrointestinal tumorigenesis in mice. **J Clin Invest**, v. 123, n. 2, p. 767-81, Feb 2013. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23321674 >.

TIAN, Y. et al. Aspirin promotes apoptosis in a murine model of colorectal cancer by mechanisms involving downregulation of IL-6-STAT3 signaling pathway. **Int J Colorectal Dis**, v. 26, n. 1, p. 13-22, Jan 2011. ISSN 1432-1262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20886344> >.

TOBAR, N. et al. Diacerhein improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice on a high-fat diet. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4080-93, Nov 2011. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21896669 >.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439> >.

ULLMAN, T. et al. Progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: effect of mesalamine. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 11, p. 1225-30; quiz 1177, Nov 2008. ISSN 1542-7714 (Electronic) 1542-3565 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18848502 >.

ULLMAN, T. A.; ITZKOWITZ, S. H. Intestinal inflammation and cancer. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1807-16, May 2011. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21530747 >.

VELAYOS, F. S.; TERDIMAN, J. P.; WALSH, J. M. Effect of 5-aminosalicylate use on colorectal cancer and dysplasia risk: a systematic review and metaanalysis of

observational studies. **Am J Gastroenterol**, v. 100, n. 6, p. 1345-53, Jun 2005. ISSN 0002-9270 (Print) 0002-9270 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15929768 >.

WANG, Y. et al. Neutrophil infiltration favors colitis-associated tumorigenesis by activating the interleukin-1 (IL-1)/IL-6 axis. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 5, p. 1106-15, Sep 2014. ISSN 1935-3456 (Electronic) 1933-0219 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24424523 >.

WEST, N. R. et al. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 10, p. 615-29, Oct 2015. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358393> >.

XIAO, H. et al. The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 461-75, Apr 2007. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17398123 >.

YAMAMOTO, Y. et al. Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. **J Biol Chem**, v. 274, n. 38, p. 27307-14, Sep 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480951> >.

YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 1, p. 41-51, Jan 2007. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186030> >.

ZHANG, Y. J. et al. mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. **Ann Surg Oncol**, v. 16, n. 9, p. 2617-28, Sep 2009. ISSN 1534-4681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517193> >.

LEGEND OF FIGURES

Figure 1 – Diacerein (DAR) prevents inflammation-induced colon carcinogenesis.

Swiss mice underwent colon cancer induction by AOM plus DSS treatment and were randomly divided into two groups, control (CTL) and DAR treated. (A) Quantification of tumor number ($n = 29\text{--}36$) and (B) tumor size ($n = 25\text{--}33$ mice/group). B16 and HT-29 tumor cells (1×10^6) were injected subcutaneously in the dorsal region of C57BL/6 and NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib mice, respectively. Tumor growth was evaluated for 13 days in B16 xenografts and for 23 days in HT-29 xenografts, and during this period the animals received treatment with DAR or vehicle (PBS) by gavage. (C) Tumor growth curve in C57BL/6 mice (CTL) and (DAR) after B16 (melanoma) xenografts ($n = 9\text{--}10$ mice/group). (D) Tumor growth curve in NOD.CB17-Prkdcscid / JUnib mice after HT-29 injection ($n = 6\text{--}7$ mice/group). Data are presented as mean $\pm$ SEM.

Figure 2 – DAR treatment suppresses chemical induced colitis. ((A) Time to first rectal bleeding episode; (B) Number of bleeding rectal episodes over time; (C) Time to the first diarrhea episode and (D) Number of diarrhea episodes over time in Swiss mice, control (CTL) and treated with Diacerein (DAR) ($n = 15\text{--}16$ mice/group). (E) Survival of Swiss animals in CTL and DAR treated groups ($n = 38\text{--}39$ mice/group). (F) Quantification of body weight ($n = 29\text{--}36$ mice/group). * $P < 0.05$

Figure 3 – DAR treatment suppresses chemical induced colitis. (A) Inflammatory Index and microphotographic representation of colon sections (magnification 5X) stained with Hematoxylin & Eosin in CTL and DAR groups ($n = 5$ mice/group), scale bar: 100 μm . (B) Quantitative RT-PCR analysis of IL-1 β , IL-6 and TNF genes in colon tissue of Swiss ($n = 17\text{--}18$ mice/group). (C) Quantification of serum IL-1 β ($n = 8\text{--}9$ mice/group), IL-6 ($n = 14\text{--}13$ mice/group). and TNF- α ($n = 12\text{--}13$ mice/group). (D) Analysis of pro-inflammatory protein expression (p-IKK, p-JNK) by immunoblot (IB) in the colon and colon cancer of Swiss mice (CTL and DAR). Data are presented as mean $\pm$ SEM.

Figure 4 – DAR treatment does not induce apoptosis or modulate cell proliferation. (A) Quantification of apoptosis by TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) and representative microphotographs of stained colon sections of CTL and DAR mice (magnification 40X), scale bar: 50 μm ; $n = 5$; five fields per colonic tissue section; mean $\pm$ SEM. (B) Quantification of Ki-67 $^+$ and representative microphotographs of stained colon sections of CTL and DAR mice

(magnification 40X), scale bar: 50 μ m, n = 5; five fields per colonic tissue section; mean $\pm$ SEM. (C) Analysis of protein expression involved in tumor growth signaling pathways (p-AKT, p70S6K-p) by immunoblot (IB) analysis in colons and colon cancer of Swiss mice (CTL and DAR).

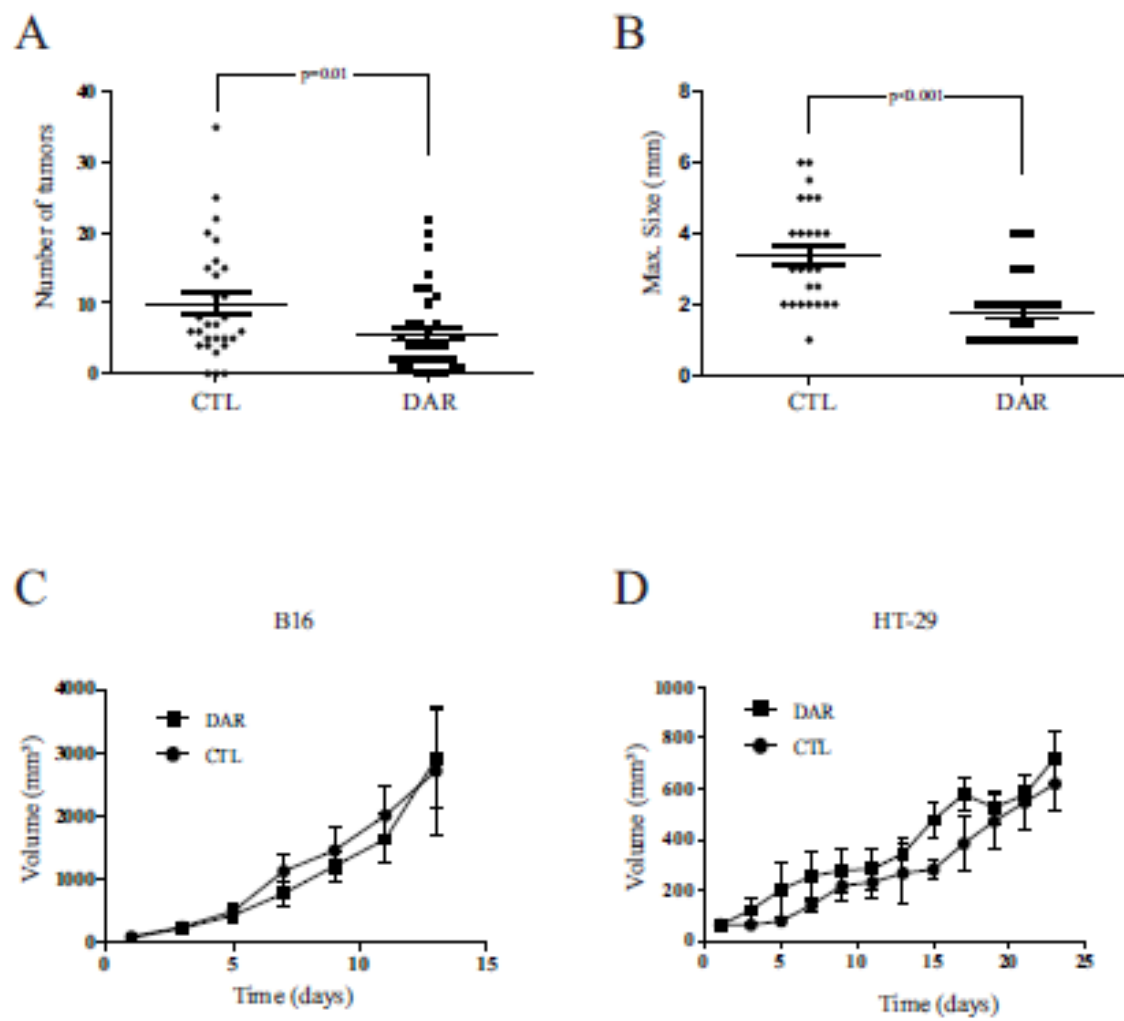
Figure 1- Diacerhein (DAR) prevents inflammation-induced colon carcinogenesis

Figure 2 – DAR treatment supresses chemical induced colitis

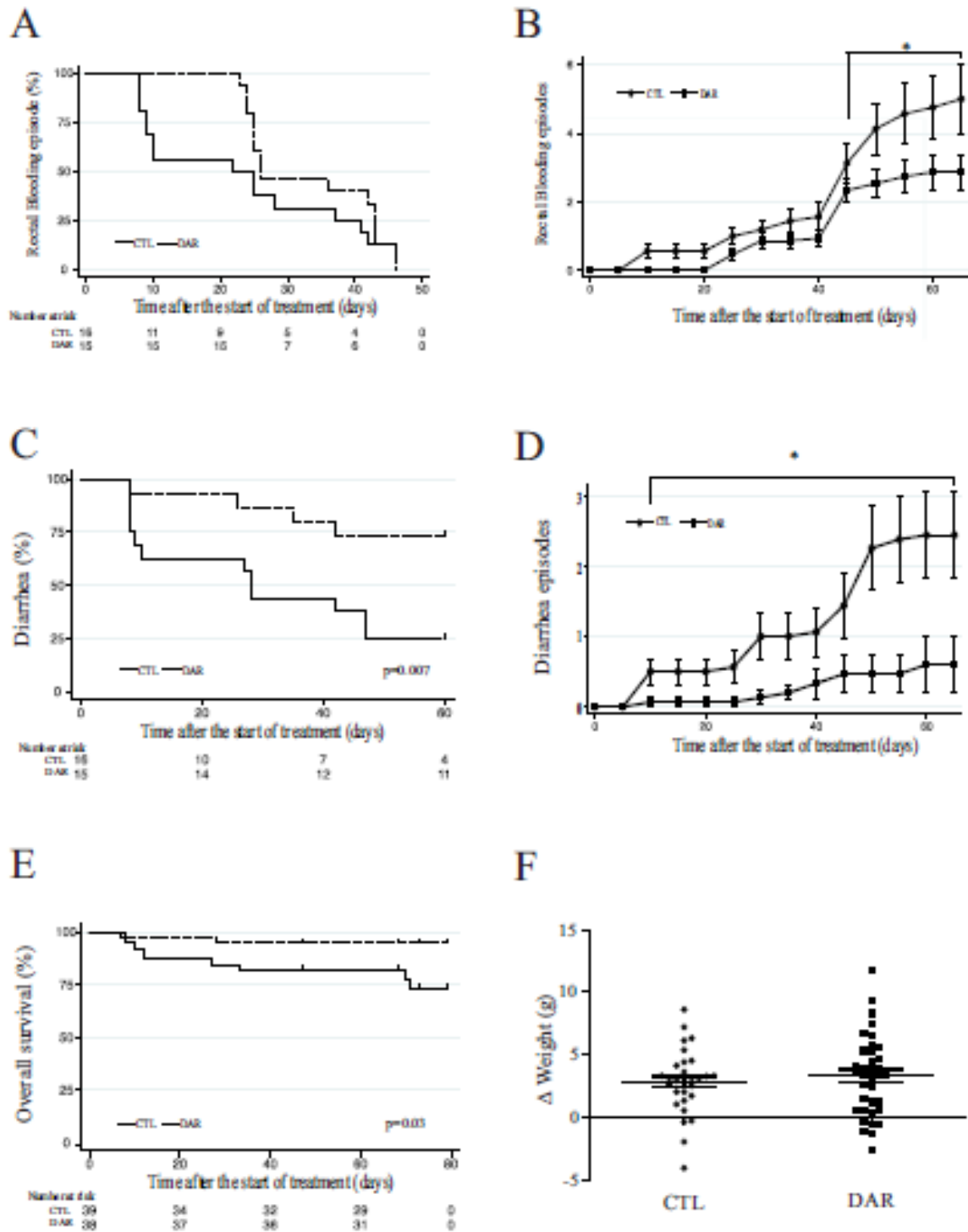


Figure 3 – DAR treatment supresses chemical induced colitis

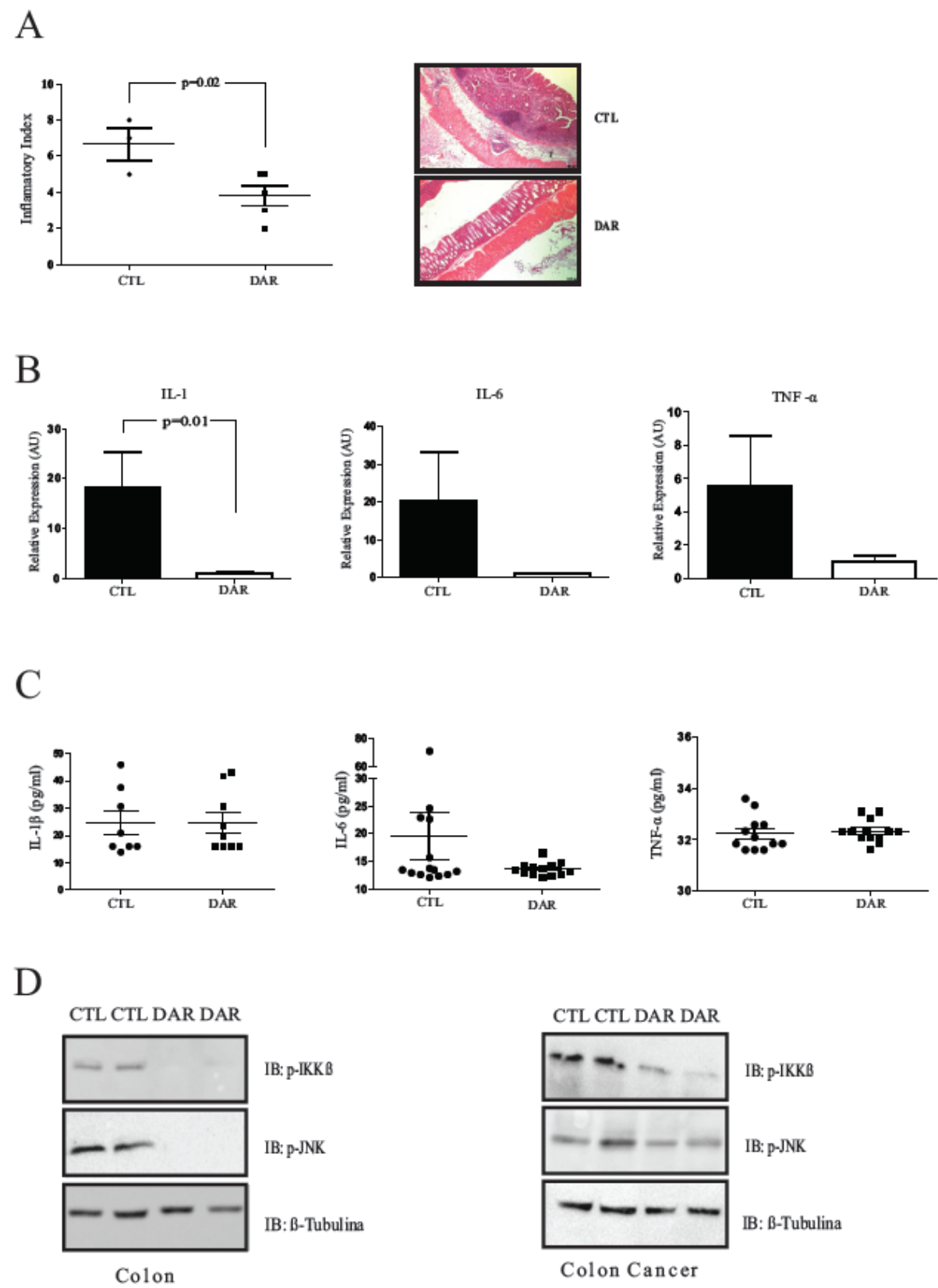


Figure 4 - DAR treatment does not induce apoptosis or modulate cell proliferation

