

Papel de la metformina en una enfermedad inflamatoria intestinal inducida experimentalmente

Role of metformin in experimentally- induced inflammatory bowel disease

ANAND P*, SUNITA J.

Department of pharmacology, L.M. College of Pharmacy, Navrangpura, Ahmedabad-3800 09.

*Author to whom correspondence should be addressed: +91 9825240367 e-mail: anand_subtle@yahoo.com

RESUMEN

En el presente trabajo, se ha estudiado la metformina, un derivado del antidiabético biguanida, para evaluar su efecto sobre una enfermedad inflamatoria intestinal inducida experimentalmente. Para inducir la enfermedad se utilizaron dos métodos: ácido 2, 4-dinitro-bencenosulfónico (DNBS) y ácido acético en ratas. El tratamiento con metformina (200 mg/kg, bid, vía oral) y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA, estándar 100 mg/kg, vía intrarrectal) durante tres días permitió prevenir de forma significativa la pérdida de peso corporal ($14,16 \pm 0,63$; $9,8 \pm 0,51$, $p < 0,05$) y reducir el índice de daño macroscópico ($1,33 \pm 0,45$; $1,12 \pm 0,24$, $p < 0,01$), respectivamente en comparación con el grupo de control tratado con DNBS ($6,66 \pm 0,23$). En ambos modelos se midieron igualmente otros parámetros: cambios de peso del colon, malondialdehído (MDA), mieloperoxidasa (MPO), superóxido dismutasa (SOD), óxido nítrico (NO) y degranulación de mastocitos. El tratamiento con metformina redujo significativamente los cambios de peso del colon, el índice de daño macroscópico, la peroxidación lipídica, el óxido nítrico (NO) y la degranulación de mastocitos en ambos modelos, sugiriendo una reducción significativa de la severidad de la inflamación en ratas.

PALABRAS CLAVE: Metformina. Ácido 2,4-dinitro-bencenosulfónico (DNBS). Ácido acético. Enfermedad inflamatoria intestinal.

ABSTRACT

In the present study, metformin, a biguanide derivative of antidiabetic was studied for evaluating its effect against experimentally-induced inflammatory bowel disease. The disease was induced by two methods: 2, 4 dinitrobenzenesulphonic acid (DNBS) and acetic acid in rats. Treatment with metformin (200mg/kg, bid, orally) and 5-aminosalicylic acid (5-ASA, standard 100mg/kg, intrarectally), for three days showed significant prevention in body weight loss (14.16 ± 0.63 ; 9.8 ± 0.51 , $p < 0.05$) and reduction in macroscopic damage score (1.33 ± 0.45 ; 1.12 ± 0.24 , $p < 0.01$) respectively when compared with the DNBS treated control group (6.66 ± 0.23). Other parameters —colon weight changes, malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), super oxide dismutase(SOD), nitric oxide (NO) and mast cell degranulation— were also measured in both the models. Metformin treatment significantly reduced colon weight changes, macroscopic damage score, lipid peroxidation, nitric oxide (NO) and mast cell degranulation levels in both the models suggesting significant reduction in the severity of inflammation in rats.

KEY WORDS: Metformin. 2,4-dinitrobenzenesulphonic acid (DNBS). Acetic acid. Inflammatory bowel disease.

Fecha de recepción: 16-07-2008

Fecha aceptación: 28-01-2009

INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, que son enfermedades inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal de etiología desconocida que se caracterizan por una ulceración recurrente crónica del intestino. Estas enfermedades se han convertido en problemas de salud importantes.

La patogénesis implica probablemente factores genéticos, ambientales e inmunológicos.¹ Se ha establecido que la mucosa de pacientes con la enfermedad de Crohn está infiltrada por linfocitos CD4+ con un fenotipo de célula T tipo 1 caracterizado por la producción de interferón γ , IL-2 y factor de necrosis tumoral $-\alpha$ (TNF- α).^{2,3} Por otro lado, en pacientes con colitis ulcerosa la mucosa puede estar infiltrada por linfocitos CD4+ con fenotipo atípico de célula T colaboradora tipo 2, caracterizados por la producción de factor transformador de crecimiento $-\beta$ e interleuquina 5, pero no IL-4.⁴ Además, los macrófagos juegan un papel fundamental en la formación de granuloma epitelioides no caseoso en la mucosa intestinal. Los macrófagos activados producen citoquinas como TNF- α , interleuquina (IL-6, IL-8) y otras.

Es bien conocido que los metabolitos reactivos del oxígeno NO juegan un papel importante en la lesión directa de la mucosa intestinal.^{5,6} Uno de los principales inductores transcripcionales de la expresión genética de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) es el factor nuclear de transcripción κ B (NF- κ B).⁷ La función reguladora de NF- κ B ha sido documentada mediante el uso de varios agentes utilizados en enfermedades inflamatorias intestinales, como la sulfasalazina, el ácido 5-aminosalicílico y los corticoides.⁸ El tratamiento con fármacos actual tiene como objetivo inducir y posteriormente mantener en remisión al paciente, así como mejorar los efectos secundarios de la enfermedad, en lugar de modificar o revertir el mecanismo patogénico subyacente.⁹ Una nueva propuesta de tratamiento que utiliza preparados de anticuerpos monoclonales ha tenido hasta ahora resultados alentadores y puede finalmente proporcionar una alternativa en el sentido de que estos fármacos modifican los mecanismos bioquímicos afectados en la inflamación. Sin embargo, el uso del tratamiento convencional para controlar la enfermedad inflamatoria intestinal resulta caro y, además, tiene asociados

INTRODUCTION

The inflammatory bowel disease, include Crohn's disease and ulcerative colitis which are chronic inflammatory disease of gastrointestinal tract and are characterized by chronic recurrent ulceration of the bowel and of unknown etiology. They have become important health problems.

The pathogenesis likely involves the genetic, environmental and immunological factors.¹ It is established that mucosa in patients with Crohn's disease is dominated by CD4+ lymphocytes with a type 1 T-cell phenotype characterized by production of interferon γ , IL-2 and tumor necrosis factor $-\alpha$ (TNF- α).^{2,3} In contrast, the mucosa in patients with ulcerative colitis may be dominated by CD4+ lymphocytes with atypical type 2 helper T-cell phenotype, characterized by the production transforming growth factor $-\beta$ and interleukin 5 but not IL-4.⁴ In addition, macrophages play a main role in the formation of noncaseous epithelioid granuloma in the intestinal mucosa. Activated macrophages produce cytokines like TNF- α , interleukin (IL-6, IL-8) and others.

It is well known that reactive oxygen metabolites and NO play an important role in direct injury against the intestinal mucosa.^{5,6} One of the major transcriptional inducers of iNOS (inducible nitric oxide synthase) gene expression is the transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B).⁷ Regulation of NF- κ B function has been documented by several agents that are used in inflammatory bowel diseases, such as sulfasalazine, 5-amino salicylic acid and corticosteroids.⁸ Current drug treatment is aimed to induce and then maintain the patient in remission and ameliorate the disease's secondary effects rather than modify or reverse the underlying pathogenic mechanism.⁹ A new treatment approach using monoclonal antibody preparations have so far produced encouraging results and may eventually provide a welcome alternative in that, these drugs modify the affected biochemical inflammation pathways. However, the management of inflammatory bowel disease with the use of conventional treatment is expensive and also associated with number of side effects. Therefore, there is a need for alternative agents which can be more or equally effective and cost effective. Metformin, a biguanide family member commonly used in the treatment of type 2 diabetes to increase liver and tissue sensitivity to insulin as well reduce hepatic glucose production. Be-

diversos efectos secundarios. Por tanto, se hacen necesarios agentes alternativos que pueden ser más o igual de efectivos y económicos. La metformina pertenece a la familia de las biguanidas y se utiliza normalmente en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 para aumentar la sensibilidad de los tejidos y el hígado a la insulina, así como para reducir la producción de glucosa hepática. Además de este efecto hipoglucemiante, se ha establecido en otros estudios que la metformina inhibe la respuesta proinflamatoria y la activación de NF- κ B en células de la pared vascular humanas (en cultivos celulares) obtenidas de pacientes con aterosclerosis diabética.¹⁰ A la luz de los estudios mencionados anteriormente, la presente investigación pretende estudiar el potencial de la metformina en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se mantuvieron ratas Wistar de ambos sexos (185-210 g) en jaulas con libre acceso a una dieta estándar de pienso para ratas y agua *ad libitum* y se dejó que se aclimataran al entorno durante una semana antes de los experimentos. El presente experimento se ajustó a las directrices del comité de ética animal de nuestro instituto. Los animales se dividieron en cuatro grupos con seis animales cada uno en ambos modelos como se describe más adelante. Se mantuvo a todas las ratas en ayuno durante 12 horas antes del procedimiento experimental.

Fármacos

La metformina fue proporcionada por Lincoln Pharmaceuticals, Ahmedabad. Tanto la disolución de los productos químicos como los fármacos se prepararon justo antes de la administración.

Metodología

En el presente estudio se utilizaron dos modelos: el modelo de colitis inducida por DNBS y el modelo de colitis difusa inducida por ácido acético.

yond glucose lowering effect, it is reported that metformin inhibits proinflammatory response and NF- κ B activation in human vascular wall cells (in culture cells) obtained from diabetic atherosclerotic patient.¹⁰ In the light of above reports the present investigation is undertaken to study the potential of metformin in the treatment of inflammatory bowel disease.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Albino rats of Wistar strain of either sex (185-210g) were housed in cages with free access to standard rat chow diet and water *ad libitum* and acclimatized to the surroundings for one week prior to the experiments. This experiment complied with the guidelines of animal ethics committee of our institute. Animals were divided in the four groups each containing six animals in both the models as described below. All rats were fasted for 12 hours prior to experimental procedure.

Drugs

Metformin was provided by Lincoln Pharmaceuticals, Ahmedabad. The solution of chemicals and drugs were prepared freshly before the administration.

Methodology

Two models were used under the study: DNBS-induced colitis and acetic acid induced diffused colitis models.

(I) 2, 4 Dinitrobenzenesulphonic acid- induced colitis¹¹

Animals were divided in to following groups.

Group I: Normal control (0.9 % saline intrarectally)

Group II: DNBS (25 mg/rat) was dissolved into 50 % ethanol(total volume 0.6 ml) and given intrarectally.

Group III: Standard 5-Aminosalicylic acid (100 mg/kg) treatment intrarectally in DNBS treated rats.

(I) Colitis inducida por ácido 2, 4 dinitro-bencenosulfónico¹¹

Los animales se dividieron en los siguientes grupos.

Grupo I: Control normal (disolución salina al 0,9%, por vía intrarrectal).

Grupo II: Se disolvió DNBS (25 mg/rata) en etanol al 50% (volumen total 0,6 ml) y se administró por vía intrarrectal.

Grupo III: Tratamiento con ácido 5-aminosalicílico estándar (100 mg/kg) por vía intrarrectal en ratas tratadas con DNBS.

Grupo IV: Tratamiento con metformina (200 mg/kg, por vía oral) en ratas tratadas con DNBS.

Se disolvió ácido 2,4-dinitro-bencenosulfónico en etanol al 50% (volumen total de 0,6 ml) y se administró por vía intrarrectal con un tubo de polietileno flexible a ratas en ayuno durante 12 horas. Se mantuvo a los animales en posición de Trendelenburg durante 15 minutos para evitar el reflujo. La colitis se indujo en los animales transcurridos tres días de tratamiento con DNBS. La colitis se caracterizó por la aparición de lesiones cólicas y diarrea sanguinolenta dentro del periodo de 3 días posteriores a la inducción. La metformina se administró (200mg/kg) por vía oral durante tres días tras la inducción de la colitis. El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA, estándar) se administró (100mg/kg) por vía intrarrectal. En el día 4, se pesó a los animales y se les sacrificó con una dosis alta de éter. A continuación, se les abrió el abdomen mediante una incisión por la línea media. Se extrajo el colon, se le retiraron los tejidos adherentes, se abrió a lo largo del borde antisimesentérico, se enjuagó, se pesó y se examinó con un sistema de puntuación morfológico y se procesó para obtener el homogenado tisular. A continuación se utilizó el homogenado resultante para medir la peroxidación lipídica y el nivel de NO (óxido nítrico). Además, también se comprobaron preliminarmente los niveles de glucosa en suero para descartar cualquier efecto hipoglucémico de la metformina mediante método enzimático (kit).

(II) Colitis difusa inducida por ácido acético^{11, 12}

Grupo I: Control normal (disolución salina al 0,9%, por vía intrarrectal).

Grupo II: Ácido acético al 10% en ratas tratadas con disolución salina (0,2 ml).

Grupo IV: Metformin (200 mg/kg, bid, orally) treatment in DNBS treated rats.

2,4 dinitrobenzenesulphonic acid (25 mg/rat) was dissolved into 50 % ethanol (total volume 0.6 ml) and given intrarectally using flexible polyethylene tube in 12 h fasted rats. The animals were kept for 15 minutes in a Trendelenburg position to avoid reflux. Colitis was induced in animals after three days with DNBS. Colitis was characterized by appearance of colonic lesions and bloody diarrhea within 3 days of induction. Metformin was administered 200mg/kg orally for three days after the induction of colitis. 5-aminosalicylic acid (5-ASA, standard) was administered 100mg/kg, intrarectally. On day 4, the animals were weighted and sacrificed by high dose of ether and abdomen was opened by a midline incision. The colon was removed, freed from surrounding tissues, opened with antimesenteric boarder, rinsed, weighted and examined using morphological scoring system for histology and processed for tissue homogenate. The resultant homogenate was then used to measure lipid peroxidation and NO (Nitric Oxide) level. In addition, serum glucose levels were also preliminarily checked to rule out any hypoglycemic effect of metformin by using enzymatic method (kit).

(II) Acetic acid- induced diffuse colitis^{11, 12}

Grupo I: Normal control (0.9 % saline intrarectally)

Grupo II: 10 % acetic acid in saline treated rats (0.2 ml)

Grupo III: Standard. 5-Aminosalicylic acid (100 mg/kg) treatment intrarectally in acetic acid treated rats.

Grupo IV: Metformin (200 mg/kg, orally) given to acetic acid treated rats.

1 ml syringe containing 10 % acetic acid in saline (0.2 ml) was given intrarectally to induce diffuse colitis. Same parameters were estimated as with DNBS model.

Parameters investigated

The parameter studied in general include body weight loss, colon weight, macroscopic damage score, malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD), nitric oxide

Grupo III: Estándar. Tratamiento con ácido 5-aminosalicílico (100 mg/kg) por vía intrarrectal en ratas tratadas con ácido acético.

Grupo IV: Administración de metformina (200 mg/kg, por vía oral) a ratas tratadas con ácido acético.

Para inducir la colitis difusa, se utilizó una jeringa de 1 ml para la administración por vía intrarrectal de ácido acético al 10% en disolución salina (0,2 ml). Se evaluaron los mismos parámetros que con el modelo de DNBS.

Parámetros investigados

En general, los parámetros estudiados incluyen pérdida de peso corporal, peso del colon, índice de daño macroscópico, malondialdehído (MDA), mieloperoxidasa (MPO), superóxido dismutasa (SOD), óxido nítrico (NO) y estudio de la degranulación de mastocitos, utilizando ambos modelos. Además, también se comprobaron preliminarmente los niveles de glucosa en suero para descartar cualquier efecto hipoglucémico de la metformina mediante método enzimático (kit).

A. Cambios de peso corporal

Tras la inducción de la colitis y el tratamiento con fármacos, se calcularon la pérdida de peso corporal porcentual y los cambios de peso del colon (g).

B. Nivel de malondialdehídos (MDA) ¹³

La cantidad de malondialdehído se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y se expresó como nmoles/mg de proteína.

C. Mieloperoxidasa (MPO) ¹⁴

La actividad de MPO se calculó mediante el índice de cambio en absorbancia y el coeficiente de extinción molar para O-dianisidina ($11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se expresó como micromoles/mg de proteína.

D. Nivel de superóxido dismutasa (SOD) ¹⁵

La actividad enzimática se expresó como U/min/mg de proteína. Una unidad de actividad enzimática se define como la concentración necesaria para una inhibición del 50% de la producción de cromógeno en un minuto en las condiciones de ensayo definidas.

(NO) and mast cell degranulation study, using both the models. In addition, serum glucose levels were also preliminarily checked to rule out any hypoglycemic effect of metformin by using enzymatic method (kit).

A. Body weight changes

After induction of colitis and drug treatment, percentage body weight loss and colon weight changes were calculated(g).

B. Malondialdehydes level (MDA)¹³

The amount of Malondialdehyde was calculated using molar extinction coefficient $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and expressed as nmoles /mg protein.

C. Myeloperoxidase (MPO)¹⁴

MPO activity was calculated by ratio of change in absorbance and molar extinction coefficient for O-dianisidine ($11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and expressed as micromoles/mg protein.

D. Superoxide dismutase level (SOD)¹⁵

The enzyme activity was expressed in terms of U/min/mg protein. One unit of enzyme activity is defined as the concentration required for the inhibition of the chromogen production by 50 % in one minute under the defined assay conditions.

E. Estimation of Nitrasive stress (NO level)¹⁶

The quantity was expressed as nmoles/mg protein.

F. Tissue protein level measurement ¹⁷

The quantity was expressed as mg/ml of tissue homogenate.

G. Histopathology ¹⁸Colon damage (macroscopic damage score) was evaluated and scored between 0-8.

H. Mast cell degranulation study ¹⁹

Mast cell degranulation study was done by using peritoneal mass cells and percentage protected mast cells were calculated.

STATISTICAL ANALYSIS

All data are presented as mean±SEM. One way ANOVA followed by Tukey's multiple tests is performed to investigate the relationship among the groups. Wilcoxon signed rank sum test was performed for nonparametric data. Correlations were considered statistically significant only when the p-value was less than 5 % or 1% ^{20, 21}

E. Estimación de estrés nitrosativo (nivel de NO) ¹⁶

La cantidad se expresó como nmoles/mg de proteína.

F. Medición del nivel de proteínas tisulares¹⁷

La cantidad se expresó como mg/ml de homogenado tisular.

G. Histopatología ¹⁸El daño del colon (índice de daño macroscópico) se evaluó y se valoró de 0 a 8.

H. Estudio de la degranulación de mastocitos¹⁹

El estudio de la degranulación de mastocitos se realizó utilizando células de la masa peritoneal y se calculó el porcentaje de mastocitos protegidos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se han expresado como media±ESM (error estándar de la media). Para investigar la relación entre los grupos se realizó un ANOVA unidireccional seguido de múltiples pruebas de Tukey. Se realizó un test de rangos signados de Wilcoxon para los datos no paramétricos. Las correlaciones se consideraron significativas desde el punto de vista estadístico cuando el valor p fue inferior a 5% ó 1% ^{20, 21}

RESULTADOS

La metformina se estudió por su acción y mecanismo de acción frente a los modelos de enfermedad inflamatoria intestinal inducida experimentalmente. Los modelos incluyen el ácido 2, 4-dinitro-bencenosulfónico (DNBS) y el ácido acético. La metformina no desencadenó ningún episodio hipoglucémico en el grupo de control de DNBS ni en el grupo tratado con DNBS+Metformina (Fig 1). La metformina previno de forma significativa la pérdida porcentual del peso corporal inicial de las ratas en comparación con los animales tratados con DNBS (Fig 2). El tratamiento con metformina revertió significativamente el aumento de peso del colon en el modelo de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DNBS en comparación con los animales del grupo de control tratados con DNBS. El tratamiento con ácido 5-aminosalicílico, un estándar de referencia, también redujo el aumento de peso del colon en comparación con el grupo de control (Fig 3). El

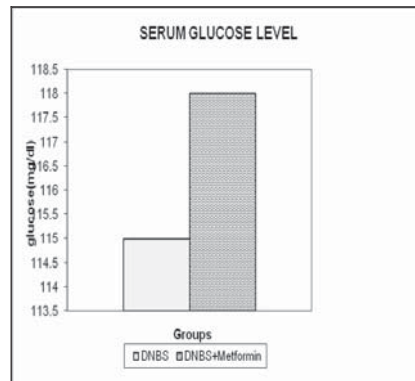
RESULTS

Metformin was studied for its action and mechanism of action against experimentally -induced inflammatory bowel disease models. The models include 2, 4-dinitrobenzenesulphonic acid (DNBS) and acetic acid. Metformin did not show any hypoglycemic events in DNBS control group as well as DNBS+ Metformin group (Fig 1). Metformin showed significant prevention in loss of percentage initial body weight of rats as compared to DNBS treated animals (Fig 2). Metformin treatment significantly reversed the rise in colon weight in DNBS -induced inflammatory bowel disease condition as compared to DNBS treated control animals. Treatment with 5-Aminosalicylic acid, a reference standard also reduced the rise in colon weight as compared to control group (Fig 3). The macroscopic damage score reflects mucosal damage index. It was increased significantly in DNBS treated control animals. However, drug as well as 5-Aminosalicylic acid (standard) treatment significantly reduced this score (Fig 4), indicating significant improvement in inflammatory bowel disease condition. Metformin was also studied for its effect on biochemical parameters: lipid peroxidation (malondialdehyde), myeloperoxidase, nitric oxide, superoxide dismutase and mast cell degranulation study. These parameters were significantly aggravated in DNBS treatment when compared with the normal rats. Metformin as well as 5-Aminosalicylic acid treatment with DNBS did show significant reduction in malondialdehyde content (MDA), when compared with the DNBS treated animals, indicating significant reduction in lipid peroxidation (Fig 5). The reduction in myeloperoxidase level was found statistically significant in case of metformin treated group as compared to DNBS treated control group. However, drug treatment showed 58 % reduction than that of standard treatment (70%) (Fig 6). Superoxide dismutase (SOD) level was reduced significantly in DNBS treated control animals. Metformin and 5-Aminosalicylic acid (Standard) treatments showed significant rise in Superoxide dismutase (SOD) level in response to protection against free radical genesis (Fig 7). In addition to lipid peroxidation, metformin treatment significantly lowered increased nitric oxide (NO) level in the presence of DNBS treatment. These results were parallel with that of 5-Aminosalicy-

índice de daño macroscópico refleja el índice de daño en la mucosa. Aumentó de forma significativa en los animales del grupo de control tratados con DNBS. Sin embargo, el tratamiento con fármacos y ácido 5-aminosalicílico redujo significativamente este índice (Fig 4), indicando una mejora significativa de la enfermedad inflamatoria intestinal. La metformina se estudió también por su efecto sobre parámetros bioquímicos: peroxidación lipídica (malondialdehído), mieloperoxidasa, óxido nítrico, superóxido dismutasa y estudio de la degranulación de mastocitos. Estos parámetros se agravaron significativamente en el tratamiento con DNBS en comparación con las ratas normales. El tratamiento con metformina así como con ácido 5-aminosalicílico, tras la administración de DNBS, provocó una reducción significativa del contenido de malondialdehído (MDA) en comparación con los animales tratados con DNBS, indicando una reducción significativa de la peroxidación lipídica (Fig 5). La reducción del nivel de mieloperoxidasa fue significativa desde el punto de vista estadístico en el caso del grupo tratado con metformina en comparación con el grupo de control tratado con DNBS. Sin embargo, el tratamiento con fármacos supuso una reducción del 58% en comparación con la obtenida con el tratamiento estándar (70%) (Fig 6). El nivel de superóxido dismutasa (SOD) se redujo significativamente en los animales del grupo de control tratados con DNBS. En los tratamientos con metformina y ácido 5-aminosalicílico (estándar) aumentó significativamente el nivel de superóxido dismutasa (SOD) como respuesta defensiva frente a la génesis de radicales libres (Fig 7). Además de la peroxidación lipídica, el tratamiento con metformina redujo significativamente el aumento del nivel de óxido nítrico (NO) producido tras el tratamiento con DNBS. Estos resultados fueron paralelos a los obtenidos con los animales tratados con ácido 5-aminosalicílico (Fig 8). Además, los tratamientos con fármacos proporcionaron una protección significativa en la degranulación de mastocitos (Fig 9) en comparación con el grupo de control. Resultados similares se obtuvieron en el modelo de colitis difusa inducido por ácido acético (Fig 2-9 segundo grupo de paneles). Por tanto, se establece a partir de los resultados obtenidos que el tratamiento con metformina revocó los cambios inflamatorios de la mucosa colónica causados por esos irritantes y que los resultados fueron comparables a los obtenidos con las ratas tratadas con ácido 5-aminosalicílico.

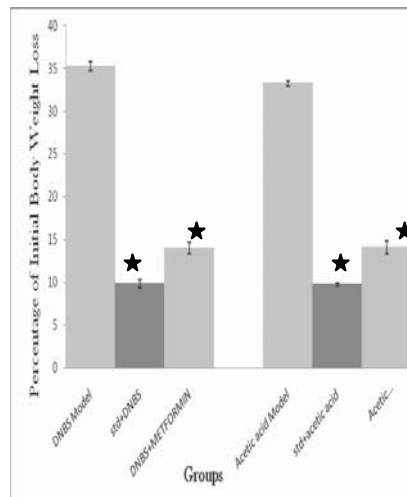
silic Acid treated animals (Fig 8). Further, drug treatments showed significant protection in mast cell degranulation (Fig 9) as compared to control group. Similar findings were observed in acetic acid model of diffused colitis (Fig 2-9 second panels). Thus, it is established from our findings that metformin treatment revoked the inflammatory changes in colonic mucosa caused by those irritants and the results were comparable with that of 5-Aminosalicylic acid treated rats.

FIGURA 1. Efecto per se de la metformina sobre los niveles de glucosa en suero en el modelo de DNBS.
FIGURE 1. Effect of Metformin on serum glucose levels per se rats in DNBS model.



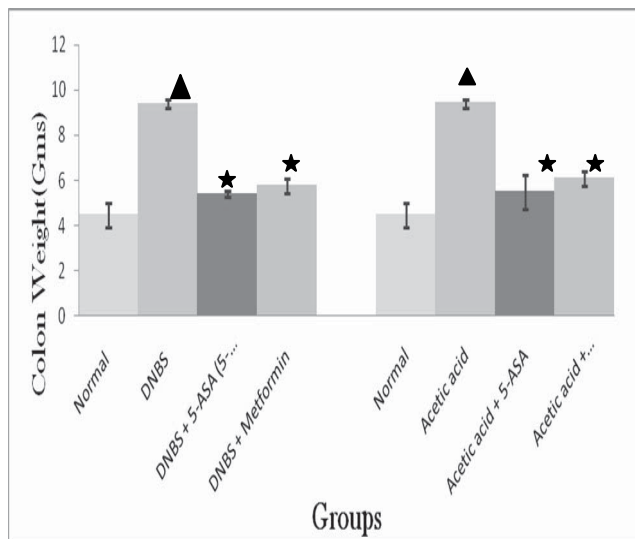
Niveles de glucosa en suero (n=4) (método enzimático) (GOD-POD).
 Serum glucose levels (n=4) (Enzymatic method) (GOD-POD).

FIGURA 2. Efecto de la metformina sobre la pérdida de peso corporal.
FIGURE 2. Effect of Metformin on Body Weight Loss.



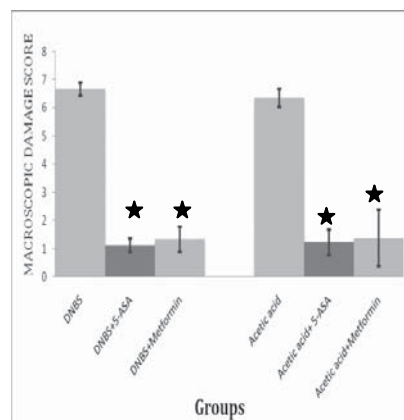
Todos los valores se han expresado como media \pm ESM (n=6), (ANOVA seguido de múltiples pruebas de Tukey). ★p <0,05 en comparación con las ratas tratadas con DNBS y las ratas tratadas con ácido acético.
 All values expressed as mean \pm SEM (n=6), (ANOVA followed by Tukey's multiple test). ★p <0.05 when compared with DNBS treated rats and Acetic acid treated rats.

FIGURA 3. Efecto de la metformina sobre el peso del colon.
FIGURE 3. Effect of Metformin on Colon Weight.

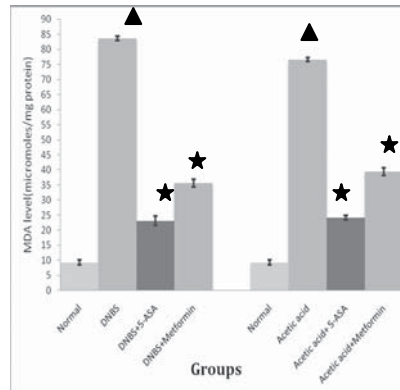


Todos los valores se han expresado como media \pm ESM (n=6), (ANOVA seguido de múltiples pruebas de Tukey). ▲p < 0,05 en comparación con las ratas normales; ★p < 0,05 en comparación con las ratas tratadas con DNBS y las ratas tratadas con ácido acético.
 All values expressed as mean \pm SEM (n=6), (ANOVA followed by Tukey's multiple test). ▲p < 0.05 when compared with the normal rats; ★p < 0.05 when compared with DNBS treated rats and Acetic acid treated rats.

FIGURE 4. Efecto de la metformina sobre el índice de daño macroscópico.
FIGURE 4. Effect of Metformin on Macroscopic Damage score.

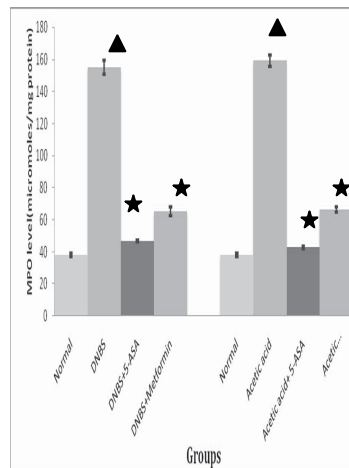


Todos los valores se han expresado como media \pm ESM (n=6), (test de rangos signados de Wilcoxon). ★p < 0,01 en comparación con las ratas tratadas con DNBS y las ratas tratadas con ácido acético.
 All values expressed as mean \pm SEM (n=6), (Wilcoxon signed rank sum test). ★p < 0.01 when compared with DNBS treated rats and Acetic acid treated rats.

FIGURA 5. Efecto de la metformina sobre la peroxidación lipídica: Nivel de malondialdehído (MDA).**FIGURE 5.** Effect of Metformin on Lipid Peroxidation: Malondialdehyde (MDA) Level.

Todos los valores se han expresado como media \pm ESM (n=6), (ANOVA seguido de múltiples pruebas de Tukey). ▲p <0,05 en comparación con ratas normales; ★p <0,05 en comparación con las ratas tratadas con DNBS y las ratas tratadas con ácido acético.

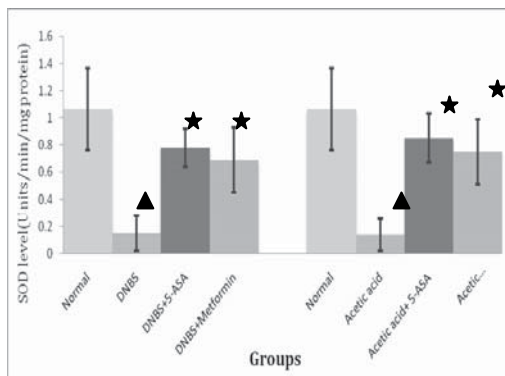
All values expressed as mean \pm SEM (n=6), (ANOVA followed by Tukey's multiple test). ▲p <0.05 when compared with normal rats; ★p <0.05 when compared with DNBS treated rats and Acetic acid treated rats.

FIGURA 6. Efecto de la metformina sobre el nivel de mieloperoxidasa (MPO).**FIGURE 6.** Effect of Metformin on Myeloperoxidase (MPO) Level.

Todos los valores se han expresado como media \pm ESM (n=6), (ANOVA seguido de múltiples pruebas de Tukey). ▲p <0,05 en comparación con ratas normales; ★p <0,05 en comparación con las ratas tratadas con DNBS y las ratas tratadas con ácido acético.

All values expressed as mean \pm SEM (n=6), (ANOVA followed by Tukey's multiple test). ▲p <0.05 when compared with normal rats; ★p <0.05 when compared with DNBS treated rats and Acetic acid treated rats.

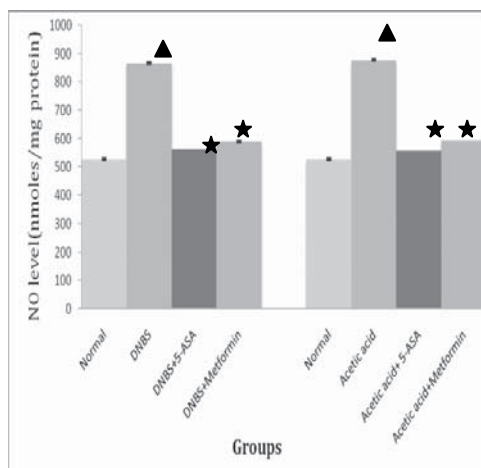
FIGURA 7. Efecto de la metformina sobre el nivel de superóxido dismutasa (SOD).
FIGURE 7. Effect of Metformin on Superoxide Dismutase (SOD) Level.



Todos los valores se han expresado como media ± ESM (n=6), (ANOVA seguido de múltiples pruebas de Tukey). ▲p <0,05 en comparación con ratas normales; ★p <0,05 en comparación con las ratas tratadas con DNBS y las ratas tratadas con ácido acético.

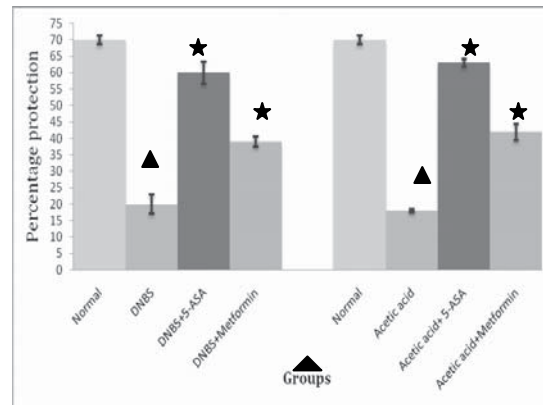
All values expressed as mean ± SEM (n=6), (ANOVA followed by Tukey's multiple test). ▲p <0.05 when compared with normal rats; ★p <0.05 when compared with DNBS treated rats and Acetic acid treated rats.

FIGURA 8. Efecto de la metformina sobre el nivel de óxido nítrico (NO).
FIGURE 8. Effect of Metformin on Nitric Oxide (NO) Level.



Todos los valores se han expresado como media ± ESM (n=6), (ANOVA seguido de múltiples pruebas de Tukey). ▲p <0,05 en comparación con ratas normales; ★p <0,05 en comparación con las ratas tratadas con DNBS y las ratas tratadas con ácido acético.

All values expressed as mean ± SEM (n=6), (ANOVA followed by Tukey's multiple test). ▲p <0.05 when compared with normal rats; ★p <0.05 when compared with DNBS treated rats and Acetic acid treated rats.

FIGURA 9. Efecto de la metformina sobre la degranulación de mastocitos.**FIGURE 9.** Effect of Metformin on Mast Cell Degranulation.

Todos los valores se han expresado como media \pm ESM (n=6), (ANOVA seguido de múltiples pruebas de Tukey). \blacktriangle $p < 0,05$ en comparación con ratas normales; \star $p < 0,05$ en comparación con las ratas tratadas con DNBS y las ratas tratadas con ácido acético.

All values expressed as mean \pm SEM (n=6), (ANOVA followed by Tukey's multiple test). \blacktriangle $p < 0.05$ when compared with normal rats; \star $p < 0.05$ when compared with DNBS treated rats and Acetic acid treated rats.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, hemos intentado evaluar la eficacia de la metformina frente a la enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DNBS (ácido 2, 4-dinitro-bencenosulfónico) y la inducida por ácido acético en ratas. La inflamación provocada por el ácido 2, 4-dinitro-bencenosulfónico (DNBS) y el ácido acético se asemeja en gran medida a la observada en el estado clínico. Varios de los principales factores causantes involucrados en la iniciación de la enfermedad inflamatoria intestinal humana como el estrés oxidativo, el aumento de la permeabilidad vascular, la infiltración neutrofílica prolongada y el aumento de la producción de mediadores inflamatorios se observaron en estos modelos con animales. Los síntomas comunes observados en la enfermedad inflamatoria intestinal son la reducción de la ingesta de alimentos, del peso corporal y del consumo de agua debido a una menor tolerancia a los alimentos y el agua. El aumento significativo del peso corporal de los animales tratados con fármacos en el presente estudio sugiere una reducción indirecta de la inflamación del colon. El examen histológico del colon transcurridos 4 días del tratamiento con metformina mostró una reducción significativa de la hiperemia de la mucosa que se representa como índice de daño de la mucosa colónica. Para estudiar más la eficacia de la metformina frente a las especies reactivas del oxígeno generadas durante la inflamación colónica, se midió

DISCUSSION

In the present work, we have made an attempt to evaluate the efficacy of metformin against DNBS (2, 4-dinitrobenzenesulphonic acid)-induced and acetic acid-induced inflammatory bowel disease in rats. The inflammation produced by 2, 4-dinitrobenzenesulphonic acid (DNBS) and acetic acid resembles to a great extent with that observed in the clinical status. Several major causative factors involved in the initiation of human inflammatory bowel disease such as oxidative stress, enhanced vascular permeability, prolonged neutrophil infiltration and increased production of inflammatory mediators are all observed in these animal models. The common symptoms observed in inflammatory bowel disease are reduction in food intake, body weight, and water intake due to reduced tolerance to food and water. Significant Increase in the body weight in the drug treated animals of the present study suggests the reduction in inflammation of the colon indirectly. The histological examination of colon after 4 days of the treatment with metformin showed significantly lesser hyperemia of the mucosa and that is represented as colonic mucosal damage score. To further study the efficacy of metformin against the reactive oxygen species generated during the colonic inflammation, we measured malondialdehyde, myeloperoxidase, nitric oxide, superoxide dismutase activities in the colonic tissues. Malondialdehyde is the final product of oxidative stress and is good indicator for extent of oxidative stress. Myeloperoxidase

la actividad de malondialdehído, mieloperoxidasa, óxido nítrico y superóxido dismutasa en los tejidos colónicos. El malondialdehído es el producto final del estrés oxidativo y es un buen indicador del alcance de dicho estrés. La mieloperoxidasa cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno proporcionalmente más estable en ácido hipocloroso inestable. Por tanto, promueve el estrés oxidativo y además induce la infiltración neutrofílica en el área de la mucosa causando más daño al tejido. Además, los estadios avanzados de la inflamación intestinal tanto en humanos como en animales ²²están asociados a un aumento de la formación de óxido nítrico por iNOS. La activación del factor de transcripción NF- κ B juega un papel importante en la expresión de iNOS y el aumento del nivel de óxido nítrico. ²³

Un gran número de estudios han revelado que el aumento del estrés oxidativo y de la actividad de iNOS es una característica notable de la enfermedad intestinal inflamatoria, lo que da como resultado una serie patológica de reacciones de radicales libres que originan radicales libres más oxidativos como el peroxinitrito (ONOO) para dañar la estructura y la función de las células. El exceso de óxido nítrico puede dilatar la vasculatura y aumentar la permeabilidad vascular, así como desactivar la actividad de antioxidantes como el superóxido dismutasa y la catalasa reaccionando con el grupo sulfhidrilo en la enzima. La superóxido dismutasa es un factor / enzima importante para la conversión de radicales libres en peróxido de hidrógeno y, por tanto, actúa como un antioxidante endógeno evitando la producción de radicales libres. Además de todo esto, también se ha implicado a los mastocitos en la patofisiología de la enfermedad inflamatoria intestinal. La alteración de los mastocitos está mediada por la activación de anticuerpos IgE. Varios mediadores como histamina, 5-HT, prostaglandinas e interleuquinas como IL-1, IL-6, TNF- α , se liberan con la degranulación de los mastocitos y producen diversas reacciones inflamatorias. ²⁴

La metformina pertenece a la familia de las biguanidas y se utiliza normalmente en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 para aumentar la sensibilidad de los tejidos y el hígado a la insulina, así como para reducir la producción de glucosa hepática. Además de este efecto hipoglucemiante, se ha establecido en otros estudios que la metformina inhibe la respuesta proinflamatoria y la activación de NF- κ B en células de la pared

catalyses the conversion of proportionally more stable hydrogen peroxide to unstable hydrochloric acid. Thus it promotes oxidative stress and additionally it induces neutrophil infiltration on mucosal area causing further damage to the tissue. Furthermore, advanced stages of bowel inflammation in humans and animals ²²are associated with enhanced formation of nitric oxide by iNOS. Activation of the transcription factor NF- κ B plays an important role in expression of iNOS and increase in nitric oxide level. ²³

Large number of studies has revealed that the increase of oxidative stress and iNOS activity is a notable feature of inflammatory bowel disease, which results into a pathological cascade of free radical reactions and further yielding more oxidative free radicals such as peroxynitrite (ONOO) to impair the structure and function of cells. Excessive nitric oxide could dilate vasculature and enhance vascular permeability, as well as inactivate the activity of antioxidants such as superoxide dismutase and catalase by reacting with hydrosulfide group in the enzyme. Superoxide dismutase is an important factor / enzyme for conversion of free radicals to hydrogen peroxide and thus acts as endogenous antioxidant preventing the production of free radicals. In addition to all these, mast cells have also been implicated in pathophysiology of inflammatory bowel disease. Mast cell disruption is mediated by activation of IgE antibodies. Various mediators like histamine, 5-HT, prostaglandins, interleukines like IL-1, IL-6, TNF- α , are released upon degranulation of the mast cells and produce the various inflammatory reactions. ²⁴

Metformin, a biguanide family member commonly used in the treatment of type 2 diabetes to increase liver and tissue sensitivity to insulin as well reduce hepatic glucose production. Beyond glucose lowering effect, it is reported that metformin inhibits proinflammatory response and NF- κ B activation in human vascular wall cells (in culture cells) obtained from diabetic atherosclerotic patient¹⁰. It is reported that there is activation of NF- κ B in inflammatory bowel disease. Therefore, inhibition of NF κ B could be a potential target for the treatment of inflammatory bowel disease. NF κ B up regulates the production of various inflammatory cytokines like IL-1, IL-6; TNF- α involved in inflammatory process and promotes the generation of reactive oxygen species. It is beyond doubt that NF κ B is

vascular humanas (en cultivos celulares) obtenidas de pacientes con aterosclerosis diabética¹⁰. Se ha establecido en otros estudios que hay activación de NF- κ B en la enfermedad inflamatoria intestinal. Por tanto, la inhibición de NF κ B puede ser un objetivo potencial en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. NF κ B regula la producción de diversas citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6; TNF- α participa en el proceso inflamatorio y promueve la generación de especies reactivas del oxígeno. Está fuera de toda duda que NF κ B es uno de los principales factores involucrados en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal. Por tanto, es de esperar que la inhibición de NF κ B tenga un efecto beneficioso en la enfermedad inflamatoria intestinal.

En el presente estudio, tanto las propiedades antioxidantes como antiinflamatorias de la metformina, así como su función protectora de los mastocitos se consideran posibles mecanismos para reducir la severidad de la enfermedad. Por tanto, estos resultados sugieren nuevos datos acerca del efecto antiinflamatorio y antioxidante de la metformina sobre ratas con colitis inducida.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a Lincoln Pharma, Ahmedabad, Gujarat, India, por proporcionarles la muestra gratuita de metformina.

one of the key factor involved in pathogenesis of inflammatory bowel disease. Thus inhibition of NF κ B can be expected to have beneficial effect in inflammatory bowel disease.

In our study, the antioxidant as well as anti-inflammatory properties and mast cell protection of metformin are considered to be likely mechanisms for reducing the severity of disease. Hence, these results suggest some new information on an anti-inflammatory and antioxidant effect of metformin on colitis induced rats.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very thankful to Lincoln Pharma, Ahmedabad, Gujarat, India, for providing the gift sample of metformin.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Sartor RB. Current concepts of the etiology and pathogenesis of Ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995; 24: 475-85.
2. Papadakis KA and Targan SR. The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 303-13.
3. Barnes PJ, Karin M . Nuclear factor-kappa B. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336:1066- 71.
4. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterol* 1998; 115:182-205.
5. Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994; 344: 859-61.
6. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Caputi AP, Riley DP, Salvemini D. Protective effects of M40403, a superoxide dismutase mimetic, in a rodent model of colitis. *Eur J Pharmacol* 2001; 432: 79-89.
7. Taylor BS, Shao L, Gambotto A. Inhibition of cytokine-induced nitric oxide synthase expression by gene transfer of adenoviral I kappa B alpha. *Surge* 1999; 126:142-47.
8. Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998; 101:1163-74.
9. Meyers S, Sachar DB. Medical therapy of Crohn's disease. In: Kersnar JB, Shorter RG ed. *Inflammatory bowel disease*, 4th ed. Williams and Wilkins, 1995: 695-714.
10. Isoda K, Young J, Zirlik A, et al. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor κ B in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:611.

11. Wallace JL, Le T, Carter L, Appleyard CB, Beck PL. Hapten-induced chronic colitis in the rat: alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995; 33: 237-39.
12. MacPherson B, Pfeiffer CJ. Experimental colitis. *Digestion* 1976; 14:42-452.
13. Ohkawa I, Ohisi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-58.
14. Chunxiang, Zhang, Lisa K. Interaction of myeloperoxidase with NADPH oxidase derived reactive oxygen species in vasculature implication for vascular defence. *Am J Physiol Circ physio* 2003; 285: H2563-72.
15. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247:3170-75.
16. Lisa A, Rindnour, Julia E, Micheal A H. A Spectrophotometric method for the direct detection and quantification of nitric oxide, nitrates and nitrite in cell culture media. *Anal Biochem* 2000; 281:223-29.
17. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:256-75.
18. Wallace JL and Keenan CM. An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis. *Am J Physiol* 1990; 258: G527-G534.
19. Orr Tsc, Hall DE, Gwilliam JM, Cox JSG. The effect of sodium cromoglycate on the release of histamine and degranulation of rat mast cells induced by compound 48/80. *Life Sci* 1971; 10:805-12.
20. Bolton S. Analysis of variance. In: Swarbrick J, ed. *Pharmaceutical statistics: practical and clinical applications*. Drugs and Pharmaceutical Sciences Series. Basel: Marcel Dekker, 1997:265-325.
21. Ghosh MN. Wilcoxon's signed rank test. In: *Fundamentals of Experimental Pharmacology*, 3rd ed, Hilton & Company, 2005:226-9.
22. Ikeda I, Kasajima T, Ishiyama S. Distribution of inducible nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:1339-41.
23. Xie Q, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 4705-8.
24. Knutson L, Ahrenstedt O, Odland B and Hallgren R. The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease. *Gastroenterol* 1990; 98: 849-54.