



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E  
FUNCIONAL

**MARIA PATRÍCIA OLIVEIRA DA SILVA REINALDO**

**EFEITO DA OLMESARTANA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM  
MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL EM RATOS**

Natal-RN

2015

**MARIA PATRÍCIA OLIVEIRA DA SILVA REINALDO**

**EFEITO DA OLMESARTANA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM  
MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Estrutural e Funcional.

Área de concentração: Biologia Tecidual.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Fernandes de Araújo Júnior

Natal-RN

2015

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Reinaldo, Maria Patrícia Oliveira da Silva.

Efeito da Olmesartana na resposta inflamatória em modelo de mucosite intestinal em ratos / Maria Patrícia Oliveira da Silva Reinaldo. – Natal, RN, 2015.

70.: il.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Fernandes de Araújo Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e funcional.

1. Mucosite intestinal. – Dissertação. 2. Inflamação. – Dissertação. 3. Olmesartana. – Dissertação. I. Araújo Júnior, Raimundo Fernandes. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 616.34-002

**MARIA PATRÍCIA OLIVEIRA DA SILVA REINALDO**

**EFEITO DA OLMESARTANA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM  
MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Estrutural e Funcional avaliada pela Comissão Julgadora composta dos seguintes membros:

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Raimundo Fernandes de Araújo Júnior (presidente)  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Natal, Brasil

---

Prof. Dr. Aurigena Antunes de Araújo (membro interno)  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Natal, Brasil

---

Prof. Dr. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (membro externo)  
Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, Brasil

Aprovada com louvor em: 19/03/2015.

*Dedico este trabalho aos meus pais, esposo, irmãos e amigos que oraram e me ajudaram de alguma forma pra que esta realização fosse possível.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao único Deus Criador e Mantenedor, por ter guiado todos os meus passos nessa fase da vida e ter me fortalecido em todos os momentos difíceis e por ter me concedido mais uma realização profissional.

Aos meus pais, pela minha educação desde criança e por me apoiar em todas as minhas escolhas, por acreditarem em mim e não medir esforços pra me ajudar.

Ao meu esposo, Robson, pelo incentivo e companheirismo, estando ao meu lado disposto a me ajudar no que fosse preciso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Raimundo Fernandes, por ter me aceitado como aluna e, além da orientação do mestrado, me fez aprender outras coisas relevantes inerentes à vida acadêmica.

À Prof. Dr. Aurigena Antunes, a qual teve atuação importante nesse trabalho, estando sempre disponível a retirar as dúvidas que surgiam.

Ao Instituto Internacional de Neurociência de Natal Edmond e Lily Safra (IINN-ELS), por ceder o microscópio confocal, importante para complementar nosso trabalho.

Aos amigos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha jornada na pós-graduação, desde a seleção até o final.

*“Porque assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos mais altos do que os vossos pensamentos”.*

*(Isaías 55:9)*

## RESUMO

A mucosite intestinal é a inflamação e/ou ulceração da mucosa do trato gastrointestinal causada pelas terapias anticâncer. Apresenta histologicamente, atrofia das vilosidades, danos nos enterócitos e infiltração de células inflamatórias. O metotrexato é um composto que inibe a dihidrofolato redutase, enzima importante na síntese de DNA. É amplamente utilizado no tratamento de leucemia e outras malignidades. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da Olmesartana (OLM), um antagonista do receptor da angiotensina II, em um modelo de mucosite intestinal (MMI) induzida por MTX em ratos Wistar. MMI foi induzido através de injeção intraperitoneal (i.p.) de MTX (7 mg/kg) durante três dias consecutivos. Os animais foram pré-tratados com OLM oral a 0.5 mg/kg, 1 mg/kg e 5 mg/kg e com solução salina, 30 minutos antes da exposição ao MTX durante três dias. Fragmentos de intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foram homogeneizados para ensaio de pesquisa das citocinas L-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ , atividade do Malonaldeído (MDA) e da Mieloperoxidase (MPO). Além disso, análises de imunohistoquímica da MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK / RANKL e SOCS-1 além da análise da co-localização da expressão de SOCS-1 pela microscopia confocal foram realizadas. O tratamento com MTX+OLM 5 mg/kg resultou numa redução da infiltração inflamatória da mucosa, ulcerações, vasodilatação e áreas hemorrágicas ( $p < 0,05$ ), bem como as concentrações reduzidas de MPO ( $p < 0,001$ ) e as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ). Além disso, o tratamento combinado reduziu a expressão de MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK e RANKL ( $p < 0,05$ ) e aumentou a expressão citoplasmática de SOCS-1 ( $p < 0,05$ ). Nossos achados confirmam o envolvimento de OLM na redução da resposta inflamatória através do aumento da sinalização imunossupressora em MMI. Sugerimos também que o efeito benéfico do tratamento com a Olmesartana é especificamente exercida durante o dano através do bloqueio de citocinas inflamatórias.

**Palavras-chave: modelo de mucosite intestinal; Olmesartana; inflamação.**

## ABSTRACT

Intestinal Mucositis is inflammation and/or ulceration of mucosa of the gastrointestinal tract caused by anticancer therapies. Histologically, villous atrophy, damage to enterocytes and infiltration of inflammatory cells. Methotrexate (MTX) is a compound that depletes dihydrofolate pools and is widely used in the treatment of leukemia and other malignancies. The aim of this study was to evaluate the effect of Olmesartan (OLM), an angiotensin II receptor antagonist, on an Intestinal Mucositis Model (IMM) induced by MTX in Wistar rats. IMM was induced via intraperitoneal (i.p.) administration of MTX (7 mg/kg) for three consecutive days. The animals were pre-treated with oral OLM at 0.5, 1 or 5 mg/kg or with vehicle 30 min prior to exposure to MTX, for three days. Small intestinal (duodenum, jejunum and ileum) homogenates were assayed for levels of the IL-1 $\beta$ , IL-10 and TNF- $\alpha$  cytokines, malondialdehyde and myeloperoxidase activity. Additionally, immunohistochemical analyses of MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK/RANKL and SOCS-1 and confocal microscopy analysis of SOCS-1 expression were performed. Treatment with MTX+OLM (5 mg/kg) resulted in a reduction of mucosal inflammatory infiltration, ulcerations, vasodilatation and hemorrhagic areas ( $p < 0.05$ ) as well as reduced concentrations of MPO ( $p < 0.001$ ) and the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ), and increase anti-inflammatory cytokine IL-10 ( $p < 0.05$ ). Additionally, the combined treatment reduced expression of MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK and RANKL ( $p < 0.05$ ) and increased cytoplasmic expression of SOCS-1 ( $p < 0.05$ ). Our findings confirm the involvement of OLM in reducing the inflammatory response through increased immunosuppressive signaling in an IMM. We also suggest that the beneficial effect of Olmesartan treatment is specifically exerted during the damage through blocking inflammatory cytokines.

**Keywords: intestinal mucositis model; Olmesartan; inflammation.**

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido aracdônico
<b>AINES</b>	Anti-inflamatórios não esteroidais
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>Ang-I</b>	Angiotensina I
<b>Ang-II</b>	Angiotensina II
<b>ARB</b>	Bloqueador do receptor de angiotensina
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ATR-1</b>	Receptor de angiotensina I
<b>ATR-2</b>	Receptor de angiotensina II
<b>AVC</b>	Acidente vascular cerebral
<b>CD4+</b>	Cluster of differentiation 4+
<b>COX</b>	Ciclo-oxigenase
<b>DHFR</b>	Diidrofolato redutase
<b>DII</b>	Doenças inflamatórias intestinais
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ECA</b>	Enzima conversora de angiotensina
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>g</b>	grama
<b>h</b>	hora
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase
<b>HTAB</b>	Brometo de hexadeciltrimetilamônia
<b>i.p.</b>	intra peritonial
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1Ra</b>	Receptor a de interleucina
<b>jak</b>	janus kinase
<b>kg</b>	quilograma
<b>LLD</b>	Limite inferior de detecção
<b>M</b>	Molar

<b>MDA</b>	Malonaldeído
<b>mg</b>	miligrama
<b>ml</b>	mililitro
<b>MMI</b>	Modelo de mucosite intestinal
<b>MMP</b>	Metaloproteinase
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MTX</b>	Metotrexato
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa beta
<b>NK</b>	Natural killer
<b>nm</b>	nanômetro
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	ânion superóxido
<b>OH<sup>-</sup></b>	radical hidroxila
<b>OLM</b>	Olmesartana
<b>p/v</b>	partes por volume
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>pg</b>	picograma
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RANK</b>	Receptor ativador do fator nuclear kappa beta
<b>RANK-L</b>	Receptor ativador do fator nuclear kappa beta ligante
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOCS</b>	Supressor de sinalização de citocinas
<b>SRAA</b>	Sistema renina angiotensina aldosterona
<b>STAT</b>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Fator de crescimento transformador
<b>TGO</b>	transaminase glutâmico oxalacética
<b>TGP</b>	transaminase glutâmico pirúvica

<b>Th2</b>	T helper 2
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TNF-R1</b>	Receptor de fator de necrose tumoral 1
<b>TNF-R2</b>	Receptor de fator de necrose tumoral 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TXA2</b>	Tromboxano A2
<b>UV-VIS</b>	Ultra violeta visível
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade
<b>w/v</b>	massa por volume
<b><math>\mu</math>g</b>	micrograma
<b><math>\mu</math>l</b>	microlitro
<b><math>\mu</math>m</b>	micrômetro

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Esquema do mecanismo de ação do bloqueador dos receptores de angiotensina II e formação de ROS segundo Seedek <i>et al</i> (2009) .....	19
<b>FIGURA 2</b> – Apresentação comercial e estrutura química espacial da Olmesartana ..	20
<b>FIGURA 3</b> – Estrutura do Metotrexato análoga à enzima diidrofolato redutase (GELADA, 2006) .....	21
<b>FIGURA 4</b> – Fases da mucosite segundo Logan <i>et al</i> (2007). 1-Iniciação; 2-Regulação positiva e geração de mensagem; 3-Sinalização e amplificação; 4-Ulceração; 5-Cura .....	24
<b>FIGURA 5:</b> Esquema da indução da mucosite intestinal, período das intervenções e divisão das amostras .....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Grupos de animais da indução da mucosite .....	25
<b>TABELA 2</b> – Scores da situação encontrada nos tecidos do intestino processados para análise histopatológica .....	40
<b>TABELA 3</b> – Scores da intensidade de marcação imunohistoquímica nos tecidos .....	42
<b>TABELA 4</b> – Caracterização das variáveis dependentes do estudo .....	45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINES) .....	16
1.2 BLOQUEADORES DOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA.....	17
1.2.1 Olmesartana.....	20
1.3 METOTREXATO E MUCOSITE INTESTINAL .....	21
1.3.1 A Fisiopatologia da Mucosite Intestinal.....	23
1.4 PAPEL DAS CITOCINAS (IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ ) NA MUCOSITE INTESTINAL .....	25
1.5 PAPEL DOS MEDIADORES QUÍMICOS (MMP-2, MMP-9, COX-2, NF-k $\beta$ , E SOCS-1) NA MUCOSITE INTESTINAL .....	27
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
2.1 GERAL .....	31
2.2 ESPECÍFICOS.....	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 DESENHO DO ESTUDO .....	32
3.1.2 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais .....	32
3.1.3 Produtos Químicos .....	33
3.1.4 Animais .....	34
3.1.5 Indução da Mucosite Intestinal Experimental.....	34
3.2 ENSAIO DA MIELOPEROXIDASE (MPO) .....	37
3.3 ENSAIO DO MALONALDEÍDO (MDA).....	37
3.4 ENSAIO DE IL-1 $\beta$ , IL-10, E TNF- $\alpha$ .....	38
3.5 LEUCOGRAMA .....	39
3.6 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	39
3.7 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK, RANKL E SOCS-1 .....	41
3.8 ANÁLISE POR IMUNOFLOURESCÊNCIA CONFOCAL.....	43
3.9 CALIBRAÇÃO INTER-EXAMINADOR .....	44
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
3.11 CARACTERIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS .....	45
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>
<b>5 ANEXO .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo fisiológico complexo que consiste na resposta orgânica diante de lesão tissular ou infecção. Este processo envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (LAINE, 2003). A resposta inflamatória é caracterizada por coordenar a ativação de várias vias de sinalização que regulam a expressão de ambos os mediadores pró e anti-inflamatórios em células residentes no tecido e recrutar leucócitos a partir do sangue. Atualmente, a maioria do conhecimento sobre a sinalização na inflamação é a partir de estudos com membros das interleucinas (IL) e receptores da família TNF (fator de necrose tumoral). IL-1 e TNF- $\alpha$  representam citocinas pró-inflamatórias que são rapidamente liberadas na lesão tecidual ou infecção.

O ácido araquidônico (AA) apresenta papel regulador chave na fisiologia celular. Consiste em um ácido graxo de 20 carbonos, liberado a partir de fosfolipídios de membrana através da enzima fosfolipase A2, a qual pode ser ativada por diversos estímulos (químico, inflamatório, traumático) (LAINE, 2003). Quando ocorre uma lesão na membrana celular, constituída fundamentalmente por fosfolipídios, a enzima fosfolipase A2, presente nos leucócitos e plaquetas, é ativada por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1. Esta enzima leva à degradação dos fosfolipídios, resultando na produção de ácido araquidônico. Este, ao ser metabolizado, forma os leucotrienos, pela ação da enzima lipo-oxigenase; e as prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxanos (TX) pela ação da enzima ciclo-oxigenase (COX), que apresenta três isoformas intituladas COX-1 (constitutiva), COX-2 (indutiva) e COX-3 (presente no SNC).

A enzima prostaglandina G/H sintase, como também é chamada a COX, apresenta dois sítios catalíticos: o sítio ciclo-oxigenase e o sítio peroxidase. O sítio ciclo-oxigenase converte o AA em PGG<sub>2</sub>, que por sua vez é reduzida ao intermediário instável PGH<sub>2</sub> pelo sítio peroxidase, o qual não é inibido pelos anti-inflamatórios não esteroideais (AINEs) (LAINE, 2003). A PGH<sub>2</sub> é convertida pelas isomerases tissulares específicas nos múltiplos prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos). A prostaglandina E<sub>2</sub> é importante por sua ação pirogênica e no aumento da sensibilidade à dor. Pela diversidade de receptores específicos e vários mecanismos reguladores, explica-se a variedade clínica de atuação das PGs, como: papel central na inflamação,

coagulação sanguínea, ovulação, parturição, metabolismo ósseo, crescimento e desenvolvimento neuronal, cicatrização de feridas, função renal, tônus vascular e respostas imunes. Por conta deste amplo papel das prostaglandinas na fisiologia humana, não é surpreendente a possibilidade do aparecimento de vários efeitos colaterais mediante o uso de AINEs.

### 1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINEs)

Conhecidos pela humanidade há cerca de 100 anos, os compostos anti-inflamatórios não esteroidais estão entre os agentes farmacológicos mais prescritos em todo o mundo. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas sendo utilizados, principalmente, no tratamento da inflamação, dor e edema. É uma classe heterogênea de fármacos, sendo na sua maioria ácidos orgânicos com ação analgésica. Inclui a aspirina e vários outros agentes inibidores das ciclo-oxigenases (COXs), seletivos ou não. A ação dos AINEs consiste na inibição das enzimas COXs, com consequente diminuição da produção de prostaglandinas, combatendo assim a inflamação, a dor e a febre.

As isoformas COX-1 e COX-2 têm pequenas diferenças, o que lhes confere funções distintas. A COX-1 apresenta 17 aminoácidos na porção aminoterminal, enquanto que a COX-2 apresenta 18 aminoácidos na porção carboxi-terminal. Embora sejam muito semelhantes na sua estrutura proteica, essas enzimas são codificadas por genes diferentes (WINTER *et al*, 1962). A COX-1 está presente em quase todos os tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino, rins) e é, por isso, denominada de enzima constitutiva. Está associada à produção de prostaglandinas e resulta em diversos efeitos fisiológicos, como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Em contraste, a COX-2 está presente nos locais de inflamação, sendo, por isso, denominada de enzima indutiva. Ela é expressa primariamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. Entretanto, se sabe que ela também se encontra em outros tecidos e órgãos, como rins, cérebro, ovário, útero, cartilagem, ossos e endotélio vascular. A COX-2 é induzida pelas citocinas (IL-1, IL-2 e TNF) e outros mediadores nos sítios de inflamação (como fatores de crescimento e endotoxinas). Sua provável expressão no sistema nervoso central tem papel na mediação central da dor e da febre.

Devido ao fato dos AINEs, em suas dosagens terapêuticas, inibirem de forma distinta ambas as isoformas da COX, esses fármacos passaram a ser caracterizados de acordo com sua capacidade de inibição da COX-1 e COX-2 (KOLLI *et al*, 2013b). Os AINEs não seletivos são os mais antigos, e designados como tradicionais ou convencionais. Os seletivos para a COX-2 são designados COXIBs.

Os efeitos adversos dos AINEs estão associados à supressão da expressão constitutiva da COX-1, resultando em lesão gástrica, hemorragia e ulceração. Isto ocorre porque há uma inibição das propriedades cito-protetoras das prostaglandinas sintetizadas pela COX-1. PGEs inibem a secreção gástrica estimulada pela alimentação, histamina ou gastrina e reduzem o volume de secreção, a acidez e conteúdo de pepsina. Esses efeitos ajudam a manter a integridade da mucosa gástrica e conferem proteção às células epiteliais.

Os inibidores seletivos da COX-2 são medicamentos que vêm sendo utilizados em algumas situações clínicas bem determinadas e podem oferecer algumas vantagens com relação aos AINEs não seletivos. Entretanto, os resultados de estudos clínicos prospectivos e de meta-análises indicam que os inibidores seletivos da COX-2 exercem importantes efeitos cardiovasculares adversos, que incluem aumento do risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca e hipertensão arterial (ANTMAN *et al*, 2005).

O descrédito dos inibidores COX-2 chama a atenção dos pesquisadores para a síntese de novas substâncias com atividades anti-inflamatórias ou a realização de pesquisas para a avaliação de substâncias já conhecidas utilizadas comumente com outras indicações. Uma classe de medicamentos que merece atenção é a dos anti-hipertensivos inibidores da angiotensina II.

## 1.2 BLOQUEADORES DOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA

Tem sido demonstrado que a angiotensina II (Ang-II) está envolvida em várias condições patológicas. A ativação da cadeia enzimática que culmina com a formação de Ang-II começa com a secreção de renina pelos rins (KOLLI *et al*, 2013a). Tal enzima proteolítica transforma o angiotensinogênio (produzido pelo fígado e encontrado no

plasma) em Ang-I, e a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) transforma a Ang-I em Ang-II. Essa conversão ocorre durante a passagem da circulação nos pulmões.

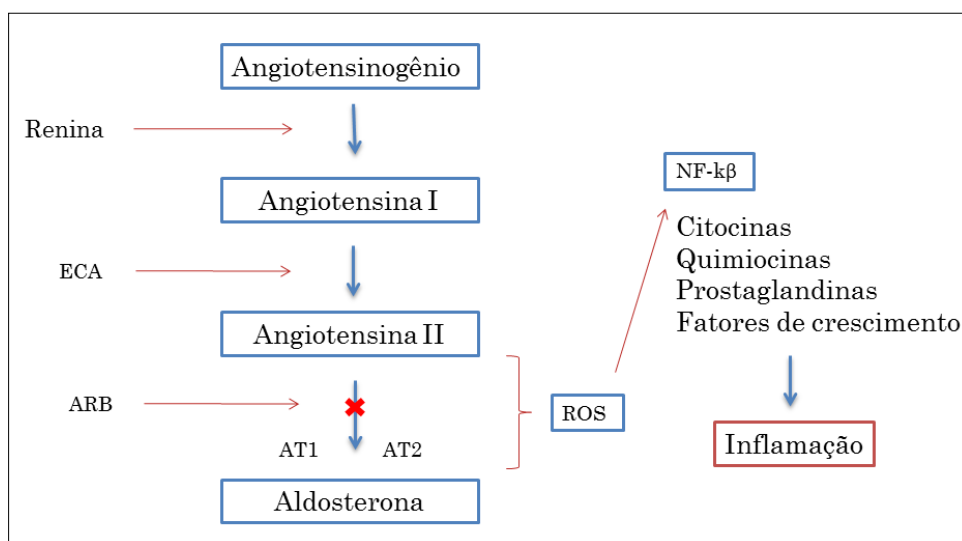
A hipertensão é uma doença grave que apresenta um importante impacto sobre a saúde e expectativa de vida. Controlar e prevenir a pressão arterial e suas complicações, tais como a doença coronariana, insuficiência renal, danos oculares e lesão cerebral (AVC) são os principais objetivos do tratamento anti-hipertensivo. A Ang-II promove o aumento da pressão arterial por diversos mecanismos e é o principal hormônio efetor no Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), que desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial. Dessa forma, a Ang-II afeta o sistema cardiovascular, influencia o tônus vascular, volume de fluido e equilíbrio de eletrólitos (VIRDIS & SCHIFFRIN, 2003).

O primeiro antagonista do receptor da Ang-II foi a Saralasin, em 1970, mas a meia-vida e ação muito curtas e seu uso parenteral não são úteis para tratamento crônico da hipertensão arterial. Há muitos anti-hipertensivos que atuam sobre o sistema SRAA. Uma classe de medicamentos que vem crescendo em popularidade é a dos bloqueadores dos receptores da angiotensina, pois apresentam excelente potencial de controle da pressão arterial, baixo perfil de eventos adversos e alta tolerabilidade pelos pacientes (BURNIER & BRUNNER, 2000).

Os estudos sobre inflamação e hipertensão arterial mostram uma estreita relação entre infiltração de células inflamatórias e o estresse oxidativo nos tecidos vasculares. De fato, um dos principais mecanismos através do qual o SRAA provoca alterações vasculares na hipertensão arterial envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), juntamente com produtos instáveis da peroxidação de lipídios, formam o grupo conhecido como espécies reativas de oxigênio (WANG *et al*, 2001). Segundo Seedek *et al* (2009), tanto a Ang II como a aldosterona são capazes de induzir a expressão da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), a principal produtora do ânion superóxido nos tecidos vasculares (FIGURA 1). Os radicais livres, por sua vez, atuam como ativadores da inflamação.

De acordo com Lee *et al* (2004) o estresse oxidativo desencadeia o início do processo inflamatório por estimular a permeabilidade vascular, através do aumento na secreção de mediadores como as prostaglandinas e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Pacientes com câncer podem ter doenças sistêmicas, como a hipertensão arterial, que são tratadas em paralelo com a quimioterapia e que podem mitigar efeitos adversos ou agravar efeitos da quimioterapia, durante o tratamento. Nosso grupo tem estudado o bloqueador dos receptores da angiotensina II (AT1-R e AT2-R). O bloqueador dos receptores da angiotensina II (ARB) tem sido implicado como um agente anti-inflamatório que suprime o fator de necrose tumoral (TNF) induzido por ativação do fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) em células endoteliais vasculares (SEEDEK *et al*, 2009).



**FIGURA 1:** Esquema do mecanismo de ação do bloqueador dos receptores de angiotensina II e a formação de ROS segundo Seedek *et al* (2009). Angiotensina II e aldosterona causam produção de ROS no endotélio vascular durante o estresse levando a liberação de mediadores inflamatórios.

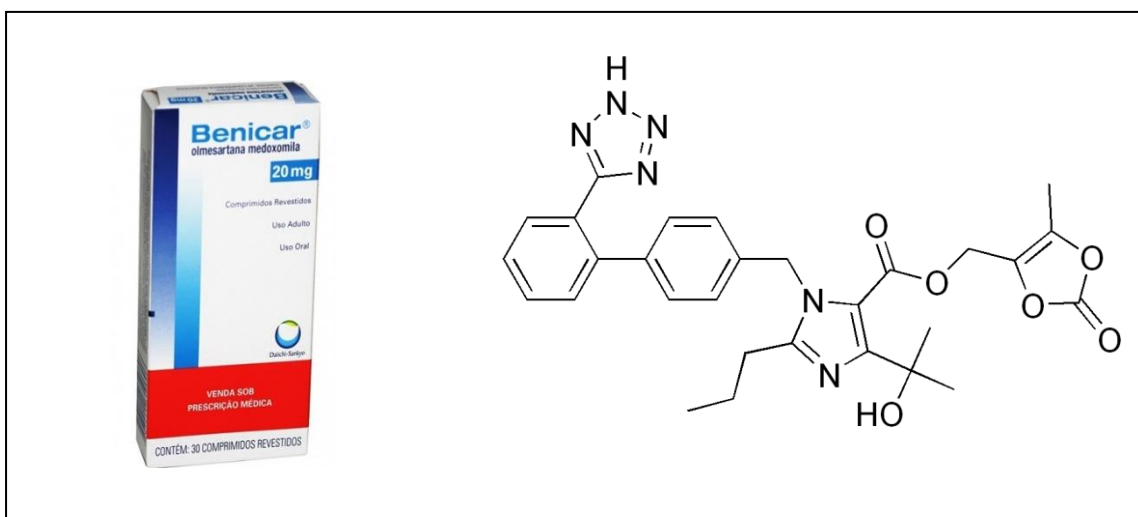
Em modelo experimental, o bloqueador do receptor de angiotensina II (ARB), Telmisartana reduziu marcadores de inflamação (ARAÚJO *et al*, 2013a). Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo utilizando outro ARB, a Olmesartana (ARAÚJO *et al*, 2013b).

### 1.2.1 Olmesartana

A Olmesartana é um exemplo de bloqueador dos receptores da angiotensina que atua bloqueando o tipo 1 dos receptores da angiotensina II (AT1-R), levando assim a prevenção da vasoconstrição, redução da retenção de sódio e água, e diminuição da proliferação celular e hipertrofia. Além de promover o bloqueio dos AT1-R.

Estudos demonstram que os níveis de Ang-II no tecido e plasma estão aumentados durante o estresse, conduzindo à liberação de espécies reativas do oxigênio a partir do músculo liso vascular com consequentes danos celulares e inflamação (TANIYAMA & GRIENGLING, 2003). Ang-II promove o aumento da permeabilidade vascular (através da liberação de prostaglandinas e do fator de crescimento de células endoteliais vasculares/fator de permeabilidade vascular) e participa do recrutamento de células inflamatórias do infiltrado tecidual através da sua ativação direta ou pela regulação da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas pelas células residentes; dessa forma, Ang-II participa de diversos eventos-chave da resposta inflamatória.

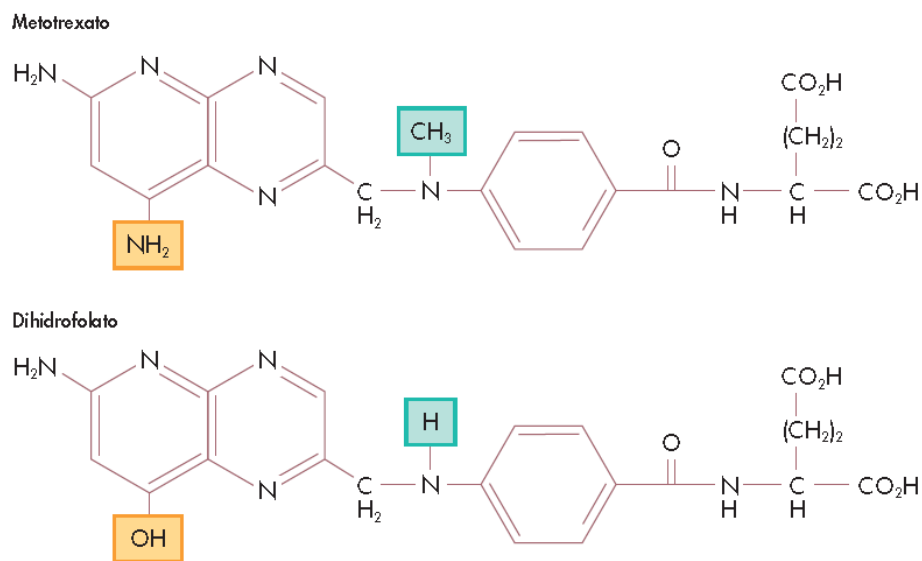
Os fármacos podem ter efeito específico sob determinados tecidos biológicos, sendo necessários modelos mais específicos para analisar a atuação de determinada substância em tecidos diferentes como, mucosite intestinal (SOARES *et al*, 2011), artrite reumatoide (SHEN *et al*, 2013) e mucosite oral (BENDERLI & DENIZ,2011).



**FIGURA 2:** Apresentação comercial e estrutura química espacial da Olmesartana.

### 1.3 METOTREXATO E MUCOSITE INTESTINAL

O metotrexato (ácido glutâmico propilo 2,4-diamino-N10-dimetil - MTX) é um antimetabólito amplamente utilizado na prática clínica atual para o tratamento de neoplasias, psoríase, artrite reumatoide e doença de Crohn. O MTX é um antagonista do ácido fólico que inibe a dihidrofolato redutase, (DHFR) de alta afinidade (FIGURA 2), resultando numa depleção de tetrahidrofolato necessário para a síntese de DNA e RNA; foi introduzido em 1948 para o tratamento de leucemia aguda em crianças. O metotrexato atua por bloqueio da síntese de DNA e RNA, induzindo a apoptose, e retarda ou para a proliferação das células (PUIG, 2013). A eficácia do MTX é muitas vezes limitada por efeitos colaterais graves e sequelas tóxicas, tais como a supressão da medula óssea, mucosite oral e intestinal. A toxicidade gastrointestinal é um dos fatores mais comuns limitantes que impede a continuação da escala da dose de MTX nos tratamentos (SOARES *et al*, 2011).



**FIGURA 3:** Estrutura do Metotrexato análoga à enzima diidrofolato redutase (GELADA, 2006).

As mucosites oral e gastrointestinal são complicações adquiridas comumente nos tratamentos anticâncer como quimioterapia, radioterapia e transplante de células-tronco hematopoiéticas, principalmente com o uso de drogas que afetam a síntese de DNA,

como por exemplo o Fluorouracil, Metotrexato e Irinotecano (YAMAMOTO *et al*, 2013). De acordo com Sukhotnik *et al* (2014), a mucosite ocorre em 40% dos pacientes tratados com quimioterapia de dose padrão e em 100% dos pacientes submetidos a quimioterapia de dose elevada. Após a quimioterapia, a mucosite gastrointestinal é mais proeminente no intestino delgado, mas também ocorre no esôfago, estômago e intestino grosso (SONIS *et al*, 2004). O trato gastrointestinal é vulnerável por causa da alta proliferação e frequência de renovação celular. Os agentes citotóxicos são mais efetivos nesse tecido tornando-se particularmente susceptível aos efeitos danosos dos antineoplásicos. Esses danos parecem envolver principalmente as células das criptas intestinais.

A mucosite intestinal é a inflamação e/ou ulceração da mucosa do trato gastrointestinal. Doenças infecciosas, deficiência imunológica e medicamentos também podem ser causadores (PETERSON *et al*, 2011). Os sintomas clínicos são, em geral, diarreia, dor abdominal, sangramento, desnutrição, desequilíbrio eletrolítico e infecções com complicações que podem ser fatais (TOUCHEFEU *et al*, 2014). Histologicamente, é caracterizada pela atrofia das vilosidades, danos nos enterócitos e infiltração de células inflamatórias. A frequência da mucosite varia, sendo influenciada por vários fatores como, diagnóstico do paciente, idade, nível de saúde, tipo, dose e frequência da administração da droga. Torna-se um importante fator limitante da terapia anticâncer, pelo fato de ser necessário diminuir ou até suspender a dose por causa dos numerosos efeitos colaterais, atrasando o tratamento, causando hospitalização prolongada, aumento de recursos e custos elevados (SONIS, 2004). As lesões ulcerativas causadas pela quimioterapia são dolorosas, restringem a alimentação e agem como sítios de infecção secundária. Concomitante com a mucosite vem a mielossupressão, neutropenia e septicemia (PICO *et al*, 1998).

Clinicamente, os efeitos diretos da quimioterapia sobre a mucosa começam logo após o início do tratamento, e o pico de gravidade ocorre aproximadamente no dia 7 ou no dia 10, com eventual resolução que ocorre dentro de duas semanas. Uma vez que desenvolvem lesões, elas curam mais rapidamente na população mais jovem.

O principal mecanismo subjacente ao desenvolvimento da mucosite foi considerado como sendo o resultado de efeitos citotóxicos diretos da quimioterapia ou radioterapia sobre as células epiteliais por apresentarem alta taxa de renovação celular (LOGAN *et al*, 2007).

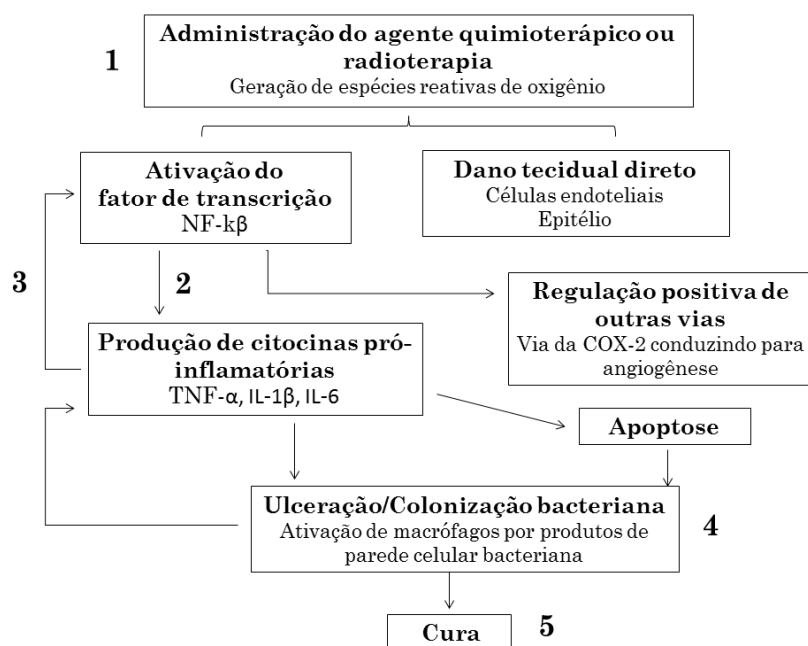
### 1.3.1 A Fisiopatologia da Mucosite Intestinal

Em 1998, SONIS propôs que a mucosite era assumida como sendo um processo biológico de quatro fases que envolvem uma fase inflamatória/vascular, uma fase epitelial, uma fase ulcerativa/microbiológica, e uma fase de cura. Cada fase é independente e é consequência de uma série de ações mediadas por citocinas e fatores de transcrição. Esse modelo foi posteriormente modificado, agora compreendendo cinco fases contínuas e sobrepostas (LOGAN *et al*, 2007) (FIGURA 3).

A primeira fase é descrita como uma fase de iniciação que ocorre imediatamente após a exposição a agentes citotóxicos e resulta em dano tecidual direto das mucosas conduzindo a lesão celular ou a morte imediata das células epiteliais e da submucosa (SULTANI *et al*, 2012). Além disso, a lesão grave do tecido pode resultar na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). A fase seguinte é de regulação positiva feita através de geração de mensagem, envolve a ativação de uma série de vias de sinalização e fatores de transcrição, o mais importante é o fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) que desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção (LAURENCE, 2009). NF- $\kappa$ B é ativado em resposta a quimioterapia e radioterapia e tem efeito sobre a integridade de toda a mucosa através da indução de morte celular, não se restringindo ao epitélio. Também resulta na ativação da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas foram todas demonstradas na mucosa, bem como no sangue periférico de pacientes submetidos a tratamento contra o câncer e têm sido sugeridas como substâncias que desempenham papel chave neste modelo de mucosite (ONG *et al*, 2010). A terceira fase envolve a amplificação desses sinais e ocorre como consequência das citocinas pró-inflamatórias que atuam através de mecanismos de *feedback* positivo. Outras proteínas biologicamente ativas de mediação pró-inflamatória, tais como a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), são reguladas positivamente e iniciam uma cascata inflamatória que conduz à ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) cuja produção provoca mais dano tecidual. Han *et al* (2000) descreve que a MMP-2 também é ativada pelo TNF- $\alpha$  em pele humana cultivada e em fibroblastos dérmicos isolados.

A mucosite é clinicamente evidente durante a fase ulcerativa onde a integridade do epitélio gastrointestinal é destruída acompanhada por colonização bacteriana e induz mais inflamação e infiltração de células inflamatórias. O paciente vai sentir dor

significativa e sintomas abdominais, o risco de infecção sistêmica é aumentado, especialmente em pacientes imunossuprimidos. Além disso, produtos bacterianos podem estimular a amplificação da produção de citocinas que conduz a uma maior potenciação da lesão do tecido. As manifestações clínicas da mucosite não são aparentes até o desenvolvimento desta fase. Após a cessação do tratamento, ocorre a fase final de cura. Esta fase resulta na recuperação de aparência normal da mucosa ao nível clínico. A reepitelização da mucosa, devido a sinais a partir da matriz extracelular é observada histologicamente. A fase de cicatrização é provavelmente a menos bem compreendida e estudada em relação à fisiopatologia da mucosite. Os estágios iniciais da inflamação na mucosite incluem o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, que funcionam como um marcador para as células imunológicas inflamatórias na submucosa.



**FIGURA 4:** Fases da mucosite segundo Logan *et al* (2007). 1-Iniciação; 2-Regulação positiva e geração de mensagem; 3-Sinalização e amplificação; 4-Ulceração; 5-Cura.

A análise da mucosite foi feita, em grande parte, com base em dados observacionais. Embora existam sugestões quanto aos seus mecanismos de desenvolvimento, a maior parte da fisiopatologia da doença é bastante indefinida (SUKHOTNIK *et al*, 2014). A escassez de informação sobre a mucosite intestinal está no fato de ser muito difícil o acesso à lesão, sendo possível apenas por meios invasivos,

como endoscopia digestiva com biópsia. Hipóteses têm sido propostas baseadas em dados clínicos de estudos com animais, mas continua a ser especulativo (FIJLSTRA *et al*, 2010). A elucidação dos mecanismos exatos envolvidos poderia revelar potencialmente alvos terapêuticos para permitir a interrupção do desenvolvimento de mucosite antes da ocorrência dos sinais e sintomas clínicos, tais como a ulceração. O tratamento eficaz da mucosite pode levar a um aumento de doses máximas toleradas e melhoria da qualidade de vida do paciente, durante e após o tratamento quimioterápico. Isso também se traduziria em uma maior probabilidade de remissão do câncer (LOGAN *et al*, 2007).

#### 1.4 PAPEL DAS CITOCINAS (IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ ) NA MUCOSITE INTESTINAL

Citocinas são mensageiros químicos induzíveis que são produzidos por uma variedade de células de todo o corpo. Elas são glicoproteínas de baixo peso molecular e estão envolvidas em ambas as respostas inflamatórias e imunes. São mediadores inflamatórios e imunomoduladores endógenos pleiotrópicos que apresentam ambos os efeitos regulatórios negativos e positivos diversos sobre células-alvo. O papel das citocinas na patogênese da mucosite tem sido investigado por vários estudos (MEIROVITZ *et al*, 2010; SULTANI *et al*, 2012; KANAREK *et al*, 2013).

IL-1 $\beta$  é uma citocina multifuncional que tem um efeito sobre uma ampla variedade de tipos de células, bem como de interagir com muitas outras citocinas. IL-1 $\beta$  faz parte de uma família de citocinas que também incluem a IL-1 $\alpha$  e receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra). Esta última molécula se liga a cada um dos dois receptores de IL-1. A IL-1 $\beta$  tem múltiplos efeitos biológicos, que têm sido demonstrados *in vitro* e *in vivo*, incluindo situações em reações sistêmicas, tais como febre e aumento da expressão de uma variedade de genes, incluindo as citocinas pró-inflamatórias e mediadores pró-inflamatórios (DINARELLO, 1996). A produção de IL-1 $\beta$  pode ser estimulada tanto por fatores microbiológicos e não microbiológicos. Este último inclui, entre muitas coisas, outras citocinas e irradiação. Juntamente com o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  é uma citocina importante que está envolvida na ativação da via NF-k $\beta$ . De fato a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  têm sido referidos como tendo um efeito sinérgico, por

exemplo, causando a indução de moléculas de adesão endoteliais essenciais para as fases iniciais da resposta inflamatória (ONG *et al*, 2010).

Níveis nos tecidos locais de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  têm sido mostrados marcadamente aumentados em modelos animais de mucosite oral induzida por quimioterapia e radiação (WU *et al*, 2011).

Fator de necrose tumoral (TNF) é uma proteína pleiotrópica que foi inicialmente isolada a partir de soro de rato após a exposição à endotoxina bacteriana. Faz parte de uma família de proteínas que possuem ambos os efeitos benéficos e potencialmente prejudiciais para o organismo. Os papéis benéficos desempenhados por membros da família TNF incluem respostas imunes inflamatórias e protetoras, bem como fatores importantes na organogênese dos órgãos linfoides secundários e manutenção da estrutura linfóide. Por outro lado, também tem sido demonstrado que TNF possui uma função de anfitrião no contexto de sepse e doenças autoimunes, tais como artrite reumatoide e doença inflamatória do intestino (DII). TNF- $\alpha$  é uma importante citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos ativados, células NK e linfócitos T. Os dois receptores para TNF são expressos em todos os tipos de células (TNF-R1), ou apenas sobre as células do sistema imunológico ou endoteliais (TNF-R2). TNF, através da interação com o TNF-R1 provoca vários acontecimentos celulares incluindo a ativação da cascata de caspases que conduz à apoptose (LOGAN *et al*, 2007).

Interação com TNF - TNF-R1 também leva à ativação de NF- $\kappa$ B (HAN *et al*, 2000). Muitos distúrbios estão frequentemente associados com uma elevação sérica dos níveis de TNF- $\alpha$ , e muitos procedimentos terapêuticos, como quimioterapia, irradiação e transplante de medula óssea, podem induzir a expressão de TNF- $\alpha$ . No que diz respeito à mucosite, vários estudos em animais e humanos têm mostrado uma diminuição da ocorrência ou gravidade de mucosite após a administração de inibidores de TNF (LOGAN *et al*, 2007).

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória central e bem pesquisada na patogênese da doença inflamatória intestinal (DII), é secretada por células CD4+, Th2, monócitos e macrófagos e outras células do sistema imune (SULTANI *et al*, 2012). IL-10 controla os processos inflamatórios através da supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, assim como apresentadores de antígeno, moléculas co-estimulatórias de monócitos/macrófagos, neutrófilos e células T.

Estudos *in vitro* iniciais demonstraram que a IL-10 suprime citocinas pró-inflamatórias derivadas de macrófagos, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12. Clarke e colaboradores (1998) apoiam a noção de que a IL-10 atenua a expressão do receptor de TNF e ainda medeia os efeitos anti-inflamatórios através da inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, um mensageiro secundário essencial necessário para induzir a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias. Juntos, estes resultados indicam IL-10 como um importante fator imunorregulador que contribui significativamente para diminuir a intensidade da resposta inflamatória por regulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias no local do dano no tecido (ASADULLAH *et al*, 2003). Assim, a baixa produção da citocina anti-inflamatória IL-10 na mucosa de pacientes com doença intestinal inflamatória (DII) tem sido considerada como um fator importante na patogênese da DII. Essencialmente reconhecida como uma condição inflamatória, a natureza altamente complexa e interativa da fisiopatologia da mucosite limita estritamente a nossa abordagem para a segmentação de uma via molecular apropriada. Essa evidência sustenta a noção de que a IL-10 é, de fato, uma citocina essencial com propriedades anti-inflamatórias que continua a ser investigada no cenário da mucosite induzida por quimioterapia (SULTANI *et al*, 2012).

### 1.5 PAPEL DOS MEDIADORES QUÍMICOS (MMP-2, MMP-9, COX-2, NF- $\kappa$ B, E SOCS-1) NA MUCOSITE INTESTINAL

As metaloproteinases de matriz (MMPs) formam um grupo de enzimas (endopeptidases) com a habilidade comum de degradar vários componentes da matriz extracelular e membrana basal, principalmente colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos. Elas são essenciais em vários processos biológicos normais como, desenvolvimento embrionário, morfogênese, reabsorção do tecido reprodutivo e remodelamento de colágeno (MEDINA E RADOMSKI, 2006). Metaloproteinases também desempenham um importante papel em processos patológicos como inflamação, artrite, doenças cardiovasculares, pulmonares e câncer.

Entre a família MMP existem dois membros originais, MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B) que quebram gelatina (colágeno desnaturado) e elastina.

Coletivamente nomeadas como colagenases do tipo IV, estas duas MMPs podem também clivar colágeno e laminina do tipo I, V, VII e XI. Isto sugere que as colagenases do tipo IV estão envolvidas na remodelação da membrana basal, uma atividade que, finalmente, regula a proliferação e migração de células durante a invasão em câncer e cicatrização de feridas (NAITO & YOSHIKAWA, 2005).

Todos os membros dessa família são secretados como enzimas. Essas enzimas são liberadas por neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e, além disso, também podem ser secretadas pelas células tumorais em resposta a uma variedade de estímulos. Essas células são capazes de responder a fatores de crescimento e citocinas, incluindo IL-1, TNF- $\alpha$  e TGF- $\alpha$ . Na presença desses fatores, essas células liberam as MMPs de grânulos específicos de armazenamento para o meio extracelular (MANICONE & McGUIRE, 2008).

Na inflamação MMPs recrutam células inflamatórias durante a lesão de tecido que envolve uma série de alterações morfológicas de barreira celular como, interação célula-célula e interação célula-matriz. Tanto a atividade da MMP-2 e MMP-9 têm sido detectadas em células epiteliais das criptas inferiores do intestino, degradando matriz, bem como ulcerações subjacentes. Tratando-se de distúrbios da mucosa intestinal, existem fortes evidências de que as MMPs são as principais proteinases participantes de alguns eventos, como em doenças inflamatórias intestinais e úlcera péptica. Estudos indicam que a MMP-9 é ausente em tecidos normais e significativamente expressa em quadros inflamatórios (WALTER *et al*, 2013).

A ciclo-oxigenase (COX) ou prostaglandina H2 sintetase é uma enzima chave na biossíntese de prostaglandinas (PGs). A COX catalisa a adição de oxigênio molecular no ácido araquidônico para formar a prostaglandina instável G2 (PGG2). Esta, dada a sua instabilidade, é convertida em uma prostaglandina mais estável, a PGH2, por uma função de peroxidase. A seguir, a PGH2 é transformada por uma grande variedade de enzimas e por mecanismos não enzimáticos em prostanóides, PGE2, PGF2 $\alpha$ , PGD2, PGI2 (prostaciclina) e TX (tromboxano) A2 (VANE *et al*, 1998). Estão bem caracterizadas duas isoformas principais de ciclo-oxigenases, a tipo um (COX-1) e a tipo dois (COX-2), as quais diferem em seus modos de regulação e distribuição teciduais. A COX-2 está normalmente ausente nas células e, quando induzida, seus níveis aumentam e diminuem, em questão de horas, após um simples estímulo. A COX-2 está envolvida em processos inflamatórios e mitóticos e é regulada positivamente em

resposta a fatores de crescimento, promotores de tumor e citocinas (HOWE & DANNENBERG, 2002).

A ativação da via da COX-2 foi demonstrada nos trabalhos de Logan *et al* (2007) na segunda fase da mucosite induzida em ratos através da indução do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, funcionando como uma outra via de ativação da inflamação.

A família do fator de transcrição NF- $\kappa$ B compreende um grupo de cinco membros diferentes: NF-  $\kappa$ B1 (p50 / p105), NF-  $\kappa$ B2 (p52 / p100), RelA (p65), RelB e c-Rel, que tem uma variada gama de efeitos biológicos. Isto é indicado pelo grande número de genes alvo que são influenciados pela ativação de NF-  $\kappa$ B (RAHMAN & FAZAL, 2011). Estes genes alvo incluem várias citocinas (incluindo, como já mencionado TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), os receptores do sistema imunológico, moléculas de adesão celular, as proteínas de fase aguda, os genes de resposta ao stress e os receptores da superfície celular. NF- $\kappa$ B é visto como um regulador mestre de respostas inflamatórias porque ele desempenha um papel essencial na evolução, bem como na fase de resolução da inflamação (GHOSH & HAYDEN, 2008). NF- $\kappa$ B controla um largo espectro de efeitos biológicos, que vão desde as respostas imunitárias induzidas pelo stress a respostas celulares tais como a proliferação, diferenciação, tumorigênese, apoptose e remodelação do tecido. Ativação inapropriada do NF- $\kappa$ B está associada com muitos estados de doença inflamatória, tais como câncer, aterosclerose, artrite, doença inflamatória do intestino (DII) e doença de Alzheimer. No que diz respeito à inflamação, NF- $\kappa$ B pode ter efeitos tanto pró-inflamatórios como anti-inflamatórios, dependendo em que fase durante o processo inflamatório da via é estimulado (LOGAN *et al*, 2007). Como mencionado anteriormente, a ativação de NF- $\kappa$ B pode ser facilitada por vários fatores, incluindo tanto a radiação e quimioterapia, bem como agentes infecciosos, o stress fisiológico e citocinas inflamatórias.

A evidência do papel de NF- $\kappa$ B em mucosite é baseada em várias observações, conforme descrito por Sonis (2002). A morte celular que resulta da quimioterapia citotóxica é atribuída à morte celular programada (PCD) ou apoptose que ocorre em ambas as populações de células normais e neoplásicas. NF- $\kappa$ B desempenha um papel importante no processo de apoptose. Também foi postulado que as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas por radiação ionizante nos tecidos pode causar ativação de NF- $\kappa$ B na mucosa intestinal normal e causar aumento da apoptose, manifestando-se clinicamente como lesão da mucosa. Outra evidência circunstancial para o papel do NF-

$\text{k}\beta$  na patogênese da mucosite é que o aparecimento e gravidade da mucosite estão associados com a sua ativação e que a inibição de citocinas pró-inflamatórias e redução da carga bacteriana levam à diminuição dos níveis de  $\text{NF-k}\beta$ , que clinicamente traduz-se numa redução da mucosite (SONIS *et al*, 2000).

Supressor de sinalização de citocina 1 (SOCS-1) pertence à família de proteínas SOCS que consiste de oito proteínas, SOCS-1-SOCS-7 e CIS, cada um dos quais tem um domínio SH2 central, um domínio amino-terminal e uma sequência carboxi-terminal conhecida como módulo de caixa de SOCS. Entre todos os membros, SOCS-1 e SOCS-3 estão mais próximos relacionados e ainda comportam uma região inibidora de quinase (KIR) que inibe a atividade da Janus quinase (Jak) (NICHOLSON *et al*, 1999). A sinalização do receptor de citocina tem sido encontrada induzindo rapidamente a expressão da proteína SOCS. Proteínas SOCS são rapidamente degradados quando a sinalização de citocina cessa e normalmente permanecem inativas nas células em repouso. Assim, a sinalização SOCS pode ter um papel central em muitos processos imunológicos, incluindo o desenvolvimento de células imunes, diferenciação e função (LIANG *et al*, 2014).

Proteínas SOCS atuam como inibidores em *feedback* negativo clássicos: elas são induzidas por várias citocinas e, subsequentemente, suprimem a sinalização de citocinas. Existem três mecanismos primários através dos quais as proteínas de sinalização SOCS suprimem citocinas. Primeiro, a proteína SOCS inibe diretamente a atividade da Janus Kinase (JAK), uma tirosina quinase intracelular que faz a transdução dos sinais mediados por citocinas. Segundo, a proteína SOCS pode suprimir a sinalização de citocinas através da competição de substrato, por exemplo, competir com os resíduos de tirosina de receptores de citocinas que fornecem locais de ancoragem para STAT, que conduz à inibição de sinalização induzida por citocina STAT. Terceiro mecanismo, SOCS pode suprimir vias de sinalização (LIANG *et al*, 2014).

Verificou-se que as proteínas SOCS regulam não só JAK/STAT, mas também outras vias de sinalização como,  $\text{NF-k}\beta$  por promoção da atividade de (p65) RelA- $\text{k}\beta$  (PARK *et al*, 2003). Strebovsky *et al* (2011) mostraram que a interação de SOCS-1 com  $\text{NF-k}\beta$  ocorre com sua translocação para o núcleo, levando a ubiquitinação e degradação, limitando assim a função do  $\text{NF-k}\beta$  como fator de transcrição.

O objetivo deste estudo foi mostrar a atividade anti-inflamatória de Olmesartana em modelo experimental de mucosite intestinal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com Olmesartana na resposta inflamatória associada à mucosite intestinal experimental induzida por Metotrexato.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito da Olmesartana nos parâmetros histopatológicos (Hematoxilina e Eosina) na mucosite intestinal induzida por Metotrexato em ratos.
- ✓ Avaliar o efeito da Olmesartana na liberação de Mieloperoxidase (MPO) e do Malonaldeído (MDA) na mucosite intestinal experimental induzida por Metotrexato em Ratos.
- ✓ Analisar os níveis da IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK, RANKL e SOCS-1 na fisiopatologia dos eventos inflamatórios da mucosite intestinal induzida por Metotrexato em ratos.
- ✓ Identificar a localização celular da SOCS-1 nas células da mucosite intestinal experimental induzida por Metotrexato em ratos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

Realizou-se um ensaio pré-clínico, *in vivo*, randomizado e controlado. As diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Utilização de Animais de Laboratório foram seguidas. Foram envidados todos os esforços para minimizar o número de animais utilizados e o seu grau de sofrimento. Os métodos utilizados nesta investigação foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande Norte (UFRN) (Número de aprovação: 016/2013). Todos os procedimentos experimentais e laboratoriais, incluindo o preparo e a manipulação dos animais, a coleta de materiais orgânicos e os diferentes tipos de análise foram realizados pelo Laboratório de Farmacologia do Centro de Biociências da UFRN, com o auxílio dos Departamentos de Bioquímica e Histologia do mesmo centro.

##### 3.1.2 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

- ✓ Balança digital eletrônica – Filizola
- ✓ Balança analítica (Analytical Standard – Ohaus)
- ✓ Centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804R – Ependorf)
- ✓ Espectrofotômetro (Spectrônic 20 – Genesys)
- ✓ Geladeira e freezer (-70°)
- ✓ Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, etc.)
- ✓ Micropipetas automáticas
- ✓ Microscópio óptico binocular
- ✓ Micrótomo (Olympus)

### 3.1.3 Produtos Químicos

- ✓ Água destilada
- ✓ Álcool etílico 70%
- ✓ Anticorpos COX-2, MMP-2, MMP-9, RANK, RANKL, SOCS-1 – Santa Cruz Biotecnologia, Interprise, Brasil
- ✓ Avidina-peroxidase (DAKO)
- ✓ Complexo DAB
- ✓ Diidrocloreto de O-dianisidina – Sigma São Paulo, Brasil
- ✓ Eosina
- ✓ Estreptavidina-HRP-conjugada – Biocare Medical, Concord, CA, EUA
- ✓ Formaldeído 40%
- ✓ Hematoxilina
- ✓ Kit de ELISA IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$  – R&D Systems, Minneapolis, MN EUA
- ✓ Metotrexato – LIBBs Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil
- ✓ Olmesartana medoxomila (Benicar 20mg) – Daiichi Sankyo Brasil Farmacêutica Ltda
- ✓ Peróxido de hidrogênio 1%
- ✓ Solução de Turk
- ✓ Soro fisiológico 0,9% (NaCl 0,1M)
- ✓ Soro normal de carneiro
- ✓ Tampão de brometo de hexadecil-metil-amônio (HTAB)
- ✓ Tampão fosfato salino (PBS)
- ✓ Tween 20
- ✓ Xilol

### 3.1.4 Animais

As experiências foram realizadas em ratos albinos machos da linhagem Wistar, com um peso compreendido entre 250 e 300 g, adquiridos no Biotério do Departamento de Biofísica e Farmacologia. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, alojados num ambiente de temperatura e umidade controlada sob um ciclo claro/escuro de 12h (luzes ligadas às 6 da manhã). Comida (Purina – Nuvilab, SP, Brasil) e água estavam disponíveis *ad libitum*.

### 3.1.5 Indução da Mucosite Intestinal Experimental

Oitenta ratos foram divididos aleatoriamente em oito grupos (cinco animais por grupo, em duplicata), como descrito a seguir:

**GRUPO CONTROLE NEGATIVO:** os animais receberam solução fisiológica (10ml/kg) oralmente por gavagem gástrica e uma hora depois foi administrado salina intraperitoneal (i.p.) (0,9% NaCl), durante 3 dias.

**GRUPO CONTROLE POSITIVO:** Os animais receberam solução fisiológica (10ml/kg) via oral por gavagem e uma hora depois foi administrado MTX (i.p.) (7 mg/kg), durante 3 dias.

**GRUPO OLM 0.5mg/kg:** os animais receberam Olmesartana (0.5mg/kg) via oral por gavagem e uma hora depois foi administrado salina (i.p.), durante 3 dias.

**GRUPO OLM 1mg/kg:** os animais receberam Olmesartana (1mg/kg) via oral por gavagem e uma hora depois foi administrado salina (i.p.), durante 3 dias.

**GRUPO OLM 5mg/kg:** os animais receberam Olmesartana (5mg/kg) via oral por gavagem e uma hora depois foi administrado salina (i.p.), durante 3 dias.

GRUPO OLM+MTX 0.5mg/kg: os animais receberam Olmesartana (0.5mg/kg) via oral por gavagem e uma hora depois foi administrado Metotrexato (i.p.) (7mg/kg), durante 3 dias.

GRUPO OLM+MTX 1mg/kg: os animais receberam Olmesartana (1mg/kg) via oral por gavagem e uma hora depois foi administrado Metotrexato (i.p.) (7mg/kg), durante 3 dias.

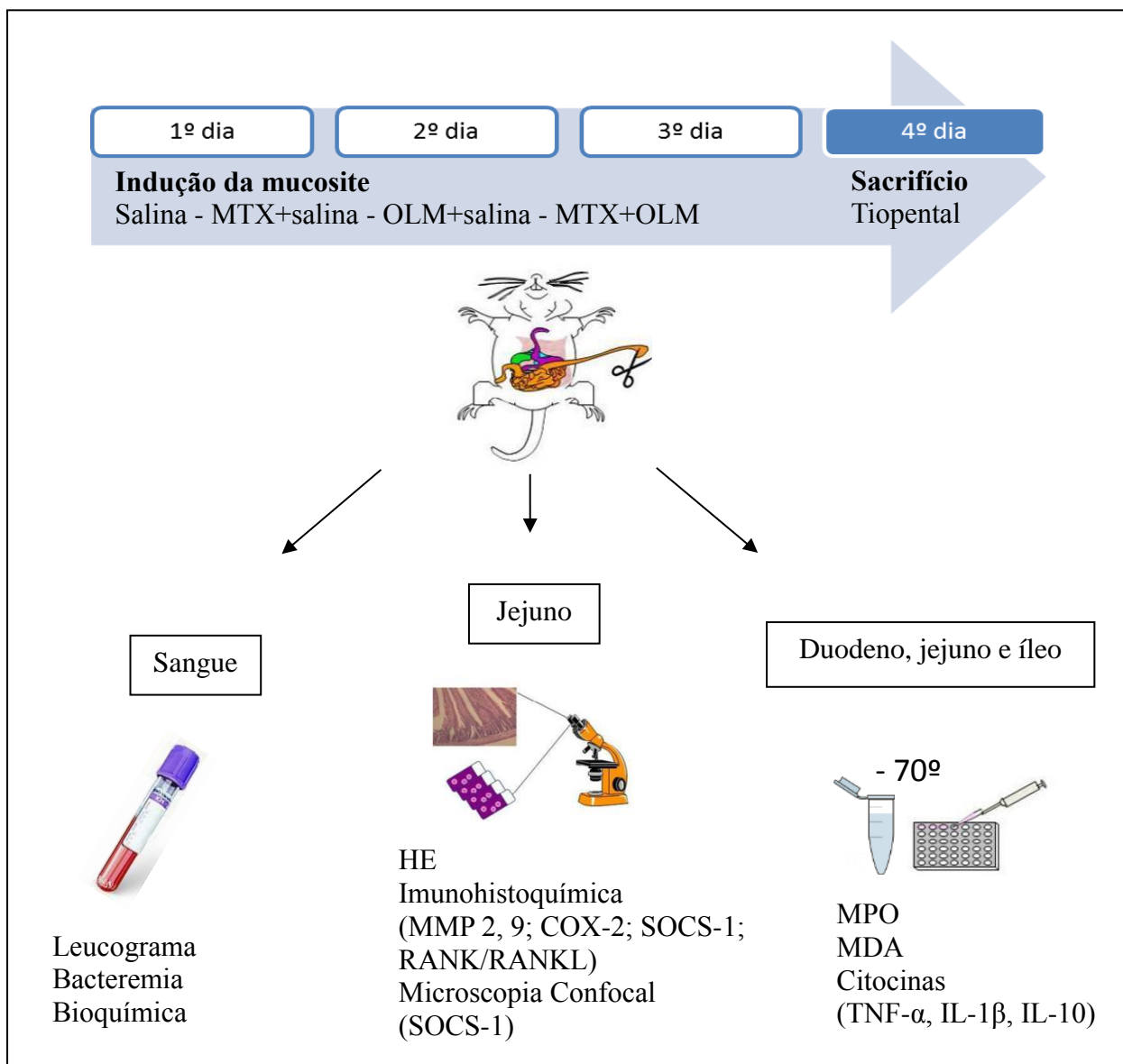
GRUPO OLM+MTX 5mg/kg: os animais receberam Olmesartana (5mg/kg) via oral por gavagem e uma hora depois foi administrado Metotrexato (i.p.) (7mg/kg), durante 3 dias.

**TABELA 1:** Grupos de animais da indução da mucosite.

<b>TRATAMENTO</b>	<b>MÚMERO</b>
<b>Controle Negativo (solução fisiológica 10 ml/kg)</b>	10
<b>Controle Positivo (Metotrexato 7 mg/kg)</b>	10
<b>Olmesartana 0.5 mg/kg + solução fisiológica 10 ml/kg</b>	10
<b>Olmesartana 1 mg/kg + solução fisiológica 10 ml/kg</b>	10
<b>Olmesartana 5 mg/kg + solução fisiológica 10 ml/kg</b>	10
<b>Olmesartana 0.5 mg/kg + Metotrexato 7 mg/kg</b>	10
<b>Olmesartana 1 mg/kg + Metotrexato 7 mg/kg</b>	10
<b>Olmesartana 5 mg/kg + Metotrexato 7 mg/kg</b>	10

Os animais foram sacrificados no quarto dia com Tiopental 2% (80 mg/kg i.p.) (Cristália, São Paulo, Brasil). Após a eutanásia, uma punção cardíaca foi realizada e amostras de sangue foram coletadas para leucograma, bacteremia e análises bioquímicas. Foram analisados os níveis de glicose, colesterol total, VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), triglicerídeos, AST (aspartato aminotransferase) ou TGO (transaminase glutâmico oxaloacética), ALT (alanina aminotransferase) ou TGP (transaminase glutâmico pirúvica), creatinina, proteínas totais, albumina e glutamina dos grupos controle negativo, MTX, MTX+OLM 0.5 mg/kg, MTX+OLM 1 mg/kg e MTX+OLM 5 mg/kg, OLM 0.5 mg/kg, OLM 1 mg/kg e

OLM 5 mg/kg. O intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) dos ratos foi congelado a -70°C para análise de citocina, mieloperoxidase (MPO) e os níveis de MDA. Os intestinos foram imersos em formol a 10% tamponado para análise histopatológica.



**FIGURA 5:** Esquema da indução da mucosite intestinal, período das intervenções e divisão das amostras.

### 3.2 ENSAIO DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A mieloperoxidase é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos liberada em resposta a micro-organismos e lesão oxidativa celular. MPO, ao reagir com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), forma radicais livres e substâncias oxidantes que causam processo inflamatório e lesão tecidual. Assim, a MPO tem sido utilizada como marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrointestinal.

A extensão da acumulação de neutrófilos nas pequenas amostras de intestino foi medida pelo ensaio de atividade de MPO. Fragmentos da mucosa intestinal (duodeno, cinco amostras por grupo; jejuno, cinco amostras de cada grupo; íleo, cinco amostras por grupo) foram recolhidos e armazenados a  $-70^\circ C$  até serem necessárias para o ensaio. Os segmentos intestinais foram colocados em tubo Falcon com tampão brometo de hexadecil-trimetil-amônio (HTAB) a 0,5% em tampão fosfato salino (50mM, pH 6,0) e homogeneizados em um homogeneizador Potter automático. Após a homogeneização, o homogenato foi congelado e descongelado por três vezes e centrifugado ( $2000\times g$  a  $4^\circ C$  durante 20 min). Foram utilizados  $100\mu l$  do sobrenadante para reagir com  $150\mu l$  do reativo de coloração (O-Dianizidina) em tampão fosfato (50mM, pH 6,0) com peróxido de hidrogênio a 0,0005% (p/v).

A atividade de MPO foi determinada por um método colorimétrico (absorbância de 450nm) através de espectrofotômetro (SOUZA *et al*, 2003). Os resultados são referidos como unidades de MPO por miligrama de tecido.

### 3.3 ENSAIO DO MALONALDEÍDO (MDA)

Malonaldeído (MDA) é um aldeído formado pela decomposição dos hidroperóxidos lipídico. Sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica que consiste na ação de radicais livres nos fosfolipídios da membrana celular, causando ruptura da membrana celular, mutações no DNA e ativação da via do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas).

Para quantificar o aumento na produção de radicais livres em amostras de tecido intestinal, o teor de MDA foi medido através do ensaio descrito a seguir. As amostras

(cinco amostras de duodeno por grupo, cinco amostras de jejuno por grupo e cinco amostras de íleo por grupo) foram suspensas em tampão Tris HCl 1:5 (w/v) e picados com uma tesoura sobre uma placa arrefecida com gelo. A suspensão resultante foi homogeneizada durante 2 minutos com um homogeneizador Potter automático e centrifugada a 2500xg a 4°C durante 10 min. Foram utilizados 300µl do sobrenadante para reagir com o reativo de coloração (1-metil-2-fenilindol) em tampão fosfato (50mM, pH 6,0) com ácido clorídrico (HCl) (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1990).

A determinação de MDA foi feita por um método colorimétrico (absorbância de 586nm) através de espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como nanomoles de MDA por grama de tecido.

### 3.4 ENSAIO DE IL-1 $\beta$ , IL-10, E TNF- $\alpha$

As amostras de tecido intestinal (cinco amostras do duodeno por grupo, cinco amostras de jejuno por grupo e cinco amostras de íleo por grupo) foram armazenadas a -70°C até a sua utilização. 100µg de tecido foram homogeneizados com 600µl de PBS (tampão fosfato salino) em um homogeneizador Ultra Stirrer e depois centrifugado (4000rpm a 4°C por 10min). O sobrenadante foi utilizado para realizar o ensaio de citocinas (SAFIEH-GARABEDIAN *et al*, 1990). Os níveis de IL-1 $\beta$  (intervalo de detecção: 62.5-4000pg/mL; sensibilidade ou o limite inferior de detecção [LLD]: 12.5ng/ml de IL-1 $\beta$  recombinante para ratos), IL-10 (intervalo de detecção: 62.5-4000pg/mL; sensibilidade ou LLD: 12.5ng/ml de IL-10 recombinante para ratos) e TNF- $\alpha$  (intervalo de detecção: 62,5-4000pg/mL; sensibilidade ou LLD: 50ng/mL de TNF- $\alpha$  recombinante para ratos) nas amostras de intestino foram determinados com um kit de ELISA comercial (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com o fabricante (KENDALL *et al*, 1983). Todas as amostras estavam dentro do comprimento de onda utilizado na espectrofotometria de UV-VIS (absorbância medida a 490nm).

Resumidamente, placas de microtitulação foram incubadas *overnight* por 16 horas a 4°C com anticorpos de ratos contra TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10. Em seguida as placas foram lavadas e bloqueadas, as amostras e os padrões foram adicionados em várias diluições em duplicata e incubados por 2 horas. As placas foram lavadas três vezes com

tampão e os anticorpos foram adicionados aos poços (biotinilado policlonal de ovelha anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  e anti-IL-10, diluídos a 1:1000 com tampão de ensaio de BSA a 1%). As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora e lavadas. Em seguida, 50 mL de avidin-HRP (1:5000) foi adicionado. O reagente colorimétrico O-fenilenodiamina (50 mL) foi adicionado 15 minutos depois e as placas foram incubadas no escuro a 37°C durante 15-20 minutos. A reação enzimática foi parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 37% e as medidas foram realizadas com absorvância de 490nm. Os valores foram expressos em pg/mL.

### 3.5 LEUCOGRAMA

Os animais foram anestesiados no dia 4 com tiopental 2% (80mg/kg, i.p.), e uma amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca. Em seguida, 20  $\mu$ l de sangue foram adicionados a 380 $\mu$ l de solução de Turk (ácido acético 2%, violeta genciana 0,2%). A contagem dos leucócitos plasmáticos foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer juntamente com o uso de microscópio óptico (100x). Os resultados foram expressos como número total de leucócitos contados nos 4 campos da câmara de Neubauer e multiplicados pelo fator de correção da câmara. Os valores foram expressos como o número de células por mililitro (ml).

### 3.6 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Jejunos foram removidos rapidamente e lavou-se com solução salina isotônica fria. Cada segmento foi pesado e cortado longitudinalmente. Três seções por grupo (cinco animais por grupo) foram analisadas. Baço, rins e o fígado foram removidos de cada grupo para estudo da toxicidade dos fármacos utilizados. Os espécimes foram fixados em formol 10% durante 24 horas, subsequentemente foi realizado processamento histológico detalhado a seguir:

- Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
  - ✓ Álcool etílico 70% (1 hora)
  - ✓ Álcool etílico 95% (1 hora)
  - ✓ Álcool etílico absoluto (1 hora)
- Passagem em xilol, 3 banhos de 1 hora cada
- Inclusão em parafina
- Cortes seriados de 5µm em micrótomo
- Montagem sobre lâminas de vidro
- Desparafinização: 3 banhos de xilol (3 minutos cada)
- Hidratação em cadeia descendente de etanóis
  - ✓ Álcool etílico absoluto (5 minutos)
  - ✓ Álcool etílico 95% (5 minutos)
  - ✓ Álcool etílico 70% (5 minutos)
- Lavagem em água destilada
- Coloração pelo método hematoxilina e eosina (HE)
- Desidratação em cadeia ascendente de etanóis
  - ✓ Álcool etílico 70% (5 minutos)
  - ✓ Álcool etílico 95% (5 minutos)
  - ✓ Álcool etílico absoluto (5 minutos)
- Passagem em xilol, 3 banhos de 3 minutos cada
- Montagem nas lâminas com Entellan

Os parâmetros de infiltração de células inflamatórias, vasodilatação, presença de áreas hemorrágicas, edema, ulcerações e abscessos foram determinados de forma simples e classificados pelos escores da TABELA 4. As alturas das vilosidades no jejuno (a partir da ponta da vilosidade até a junção das vilosidades com a cripta) foram medidas (em µm) nas secções coradas com H&E.

**TABELA 2:** Scores da situação encontrada nos tecidos do intestino processados para análise microscópica.

<b>SCORE</b>	<b>SITUAÇÃO TECIDUAL</b>
<b>1</b>	Epitélio normal, tecido conjuntivo sem vasodilatação, ausência ou infiltração celular discreta, ausência de áreas hemorrágicas, ulcerações ou abscessos.
<b>2</b>	Vasodilatação discreta e áreas de reepitelização, infiltrado inflamatório discreto com predomínio mononuclear, ausência de áreas hemorrágicas, edema, ulcerações ou abscessos.

- |   |  |
|---|--|
| 3 | Vasodilatação moderada, áreas de degeneração hidrópica epitelial, infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos, presença de áreas hemorrágicas, edema e eventuais ulcerações e ausência de abscessos. |
| 4 | Vasodilatação grave, infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos, presença de áreas hemorrágicas, edema, ulcerações e abscessos.   |
- 

### 3.7 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK, RANKL E SOCS-1

Secções de jejuno (4µm) foram obtidas a partir de cada grupo (controle negativo, MTX e MTX + OLM 5mg/kg) com um micrótomo e transferido para lâminas revestidas de gelatina. Cada secção do tecido foi então desparafinizada e reidratada. As fatias de tecido intestinal foram lavadas com 0,3% de Triton X-100 em tampão de fosfato (PBS) e banhadas com peroxidase endógena (3% de peróxido de hidrogênio). As secções de tecido foram incubadas *overnight* a 4°C com diluições 1:400 de anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, Interprise, Brasil) contra a COX-2, MMP-2, MMP-9, SOCS-1, RANK e RANKL. Testes de diluição (3 diluições) foram realizadas com todos os anticorpos para o identificar a diluição 1:400, conforme adequado. Os fragmentos foram lavados com tampão fosfato e incubados com Estreptavidina/anticorpo secundário conjugado com HRP (Médico Biocare, Concord, CA, EUA) durante 30 minutos. A imunorreatividade para as várias proteínas foi visualizada com um estojo de detecção colorimétrica-base, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (TrekAvidin-HRP rótulo + Kit de Biocare Medical, Dako, EUA). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina. Controles positivos conhecidos e os controles negativos foram incluídos em cada conjunto de amostras. Microscopia por planimetria digital (Olympus BX50, Morfologia Departamento/UFRN) com uma objetiva de alta potência (40 vezes) foi utilizada para marcar a intensidade da imunomarcção celular (TABELA 5). O detalhamento do processamento imunohistoquímico está descrito a seguir:

- As lâminas ficaram incubadas na estufa por 24 horas
- Desparafinização: 2 banhos em xilol (10 minutos cada)
- Reidratação: 3 banhos em álcool etílico absoluto (3 minutos cada)
- Álcool etílico 95% por 3 minutos
- Álcool etílico 70% por 3 minutos
- Lavagem com água destilada
- Lavagem com PBS
- Recuperação antigênica (proteínase K) por 15 minutos
- Lavagem com PBS
- Bloqueio da peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos)
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas)
- Aplicação da proteína block por 10 minutos
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas)
- Lavar com PBS por 2 vezes
- Aplicação do anticorpo primário específico e incubação (*overnight*), mínimo 18 horas
- Remoção do excesso do anticorpo primário com a pisceta com PBS
- Aplicação do anticorpo secundário kit DAKO LAB (LSAB+System-HRP)
- Usando o primeiro link do kit por 30 minutos
- Lavagem por 2 vezes com PBS
- Strepto-avidina HRP por 30 minutos
- Lavagem por 2 vezes com PBS
- Incubação com DAB por 10 minutos
- Lavar com água destilada
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos)
- Lavar com água corrente
- Desidratação com álcool 95%
- Álcool absoluto (3 banhos de 10 segundos cada)
- Xilol (3 banhos de 10 segundos cada)
- Montagem das lâminas com Entellan

**TABELA 3:** Scores da intensidade de marcação imunohistoquímica nos tecidos.

SCORES	MARCAÇÃO
1	Ausência de células positivas.
2	Número reduzido de células positivas ou células isoladas.
3	Moderado número de células positivas.
4	Grande número de células positivas.

A intensidade da marcação foi avaliada por dois examinadores previamente treinados de forma duplo-cego. Foram avaliadas três secções de tecido por animal (cinco animais por grupo).

### 3.8 ANÁLISE POR IMUNOFLOURESCÊNCIA CONFOCAL

Três secções por animal (cinco animais por grupo) foram imunomarcadas por anticorpos de fluorescência para revelar o padrão de reatividade da SOCS-1. Resumidamente, secções foram removidas do congelador, levada até à temperatura ambiente durante 10min e lavados por 10 minutos em PBS. Eles foram pré-tratados durante 25 minutos a 60°C em 0,2M de ácido bórico (pH 9,0). As secções foram arrefecidas durante cerca de 20min e lavou-se em 0,1M PBS-Tween durante 10 minutos (2x 5 minutos), seguido por incubação em 10% de soro de cabra normal (Vector Laboratories, EUA) durante 30 minutos. As secções foram incubadas durante a noite com SOCS-1 anticorpo primário de coelho (1:400 em 1% de soro normal de cabra; Santa Cruz Biotechnology, EUA) a 18°C, lavadas em 0,1M PBS-Tween durante 10 minutos (2 x 5 minutos) e incubadas com Alexa Fluor 488 de cabra conjugado com anticorpo secundário anti-coelho (1:700 em 0,1M PBS, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). Finalmente, as secções foram montadas usando meio de montagem para fluorescência Vectashield (DAPI / Antifade solução, Vector Laboratories, EUA). Imagens fluorescentes foram obtidas num Laser Scanning Microscope Carl Zeiss (LSM 710, 20x e 63x, Carl Zeiss, Jena, Alemanha, o Instituto Internacional de Neurociências de Natal, Brasil).

Os controles positivos e negativos foram incluídos em cada lote de amostras. A reatividade do tecido em todos os grupos (controlo negativo, MTX e MTX-OLM 5mg/kg) foi avaliada através da análise de densitometria computadorizada, utilizando imagens digitais capturadas com o microscópio confocal. Os valores médios densitométricos foram obtidos utilizando o software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). As medidas foram obtidas a partir de uma janela quadrada 0,02 mm<sup>2</sup> posicionada em todas as regiões de interesse (na mucosa, três amostras por animal). Para minimizar os efeitos da variabilidade dentro do grupo, utilizou-se uma escala normalizada com base na camada muscular subjacente (em média sobre as medições de três locais diferentes,

utilizando a mesma janela). Para cada animal, a densidade óptica média (DO) para as regiões de interesse (mucosa) foi designada R. O diâmetro externo da camada muscular subjacente foi designado L. Para comparar a reatividade de SOCS entre os três grupos, um índice de contraste foi calculado de acordo com a equação:  $C = (R - G) / (R + L)$  (modificado a partir de Freire *et al*).

### 3.9 CALIBRAÇÃO INTER-EXAMINADOR

A padronização na análise de dados é de extrema importância durante a realização da pesquisa. Um dos requisitos para assegurar a fidedignidade dos achados é a minimização de variações e erros. Sendo assim, fez-se necessária a realização de um processo de calibração com o objetivo de obter a confiabilidade do estudo e verificar a reprodutibilidade inter-examinador.

Para tanto, foi realizada a calibração inter-examinador para o estudo histopatológico em que cada examinador avaliou 10 casos iguais, e a partir dos dados obtidos, foi calculado o coeficiente Kappa. O valor obtido para o estudo histológico foi de 0,812, sendo considerado bom. Dessa forma, ficou comprovada a reprodutibilidade entre os examinadores.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como médias e erros padrão (MEV) ou medianas, quando for o caso. Análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Bonferroni foram utilizados para calcular as médias. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi usado para comparar medianas (GraphPad Prism 5.0 Software, La Jolla, CA, EUA). Valor de  $p < 0,05$  indicou uma diferença estatisticamente significativa.

## 3.11 CARACTERIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

**TABELA 4:** Caracterização das variáveis dependentes do estudo.

<b>VARIÁVEL</b>	<b>CATEGORIA</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO</b>
<b>Análise histopatológica</b>	1-Epitélio normal, tecido conjuntivo sem vasodilatação, ausência ou infiltração celular discreta, ausência de áreas hemorrágicas, ulcerações ou abscessos. 2-Vasodilatação discreta e áreas de reepitelização, infiltrado inflamatório discreto com predomínio mononuclear, ausência de áreas hemorrágicas, edema, ulcerações ou abscessos. 3-Vasodilatação moderada, áreas de degeneração hidrópica epitelial, infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos, presença de áreas hemorrágicas, edema e eventuais ulcerações e ausência de abscessos. 4-Vasodilatação grave, infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos, presença de áreas hemorrágicas, edema, ulcerações e abscessos.	Nominal ordinal
<b>Imunohistoquímica COX-2</b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua
<b>Imunohistoquímica MMP-2</b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua
<b>Imunohistoquímica MMP-9</b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua
<b>Imunohistoquímica RANK</b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua
<b>Imunohistoquímica RANKL</b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua
<b>Imunohistoquímica SOCS-1</b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua
<b>Dosagem IL-1<math>\beta</math></b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua
<b>Dosagem IL-10</b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua
<b>Dosagem TNF-<math>\alpha</math></b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua
<b>Dosagem MPO</b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua
<b>Dosagem MDA</b>	Número de células marcadas por mm <sup>2</sup>	Quantitativa contínua

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-DASOOQI, N.; GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; *et al.* Matrix metalloproteinases are possible mediators for the development of alimentary tract mucositis in the dark agouti rat. **Experimental Biology and Medicine** (Maywood), 235: 1244-1256, 2010.

ANTMAN, E. M.; DEMETS, D.; LOSCALZOJ. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation**, 112(5):759-70, 2005.

ARAÚJO, A. A.; SOUZA, T. O.; MOURA, L. M.; *et al.* Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- $\alpha$ , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. **Journal of Clinical Periodontology**, 40(12): 1104–1111, 2013.

ARAÚJO, A. A.; SOUZA, L. G.; SOUZA, T. O.; *et al.* Olmesartan decreases IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 386(10): 875-84, 2013.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 Therapy Review of a new approach. **Pharmacological Review**, 55(2): 241–269, 2003.

BENDERLI, C. Y.; DENIZ, K. Effect of propolis against radiation-induced oral mucositis in rats. Kulak burun bogaz ihtisas dergisi : KBB = **Journal of ear, nose, and throat**, 21(1): 32-41, 2011.

BOUKHETTALA, N.; LEBLOND, J.; CLAEYSSSENS, S.; FAURE, M.; LE PESSOT, F.; *et al.* Methotrexate induces intestinal mucositis and alters gut protein metabolism independently of reduced food intake. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, 296(1): 182-190, 2009.

BURNIER, M.; BRUNNER, R. H. Angiotensin II receptor antagonists. **The Lancet**, 355(9204): 637-645, 2000.

CHANG, C. T.; HO, T. Y.; LIN, H.; LIANG, J. A.; HUANG, H. C.; *et al.* 5 Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- $\kappa$ B activation by transcriptomic analysis and *in vivo* bioluminescence imaging. **Plos One**, 7(3): 1, 2012.

CLARKE, C. J.; HALES, A.; HUNT, A.; FOXWELL, B. M. IL-10- mediated suppression of TNF- $\alpha$  production is independent of its ability to inhibit NF- $\kappa$ B activity. **European Journal of Immunology**, 28(5): 1719–1726, 1998.

DUNCAN, M.; GRANT, G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 18(9): 853-874, 2003.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **The Journal of the American Society of Hematology**. *Blood*, 87(6): 2095-2147, 1996.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, 186: 407- 421, 1990.

FIJLSTRA, M.; RINGS, E. H. H. M.; VERKADE, H. J.; DIJK, T. H.; KAMPS, W. A.; TISSING, W. J. E. Lactose maldigestion during methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. **American Physiological Society**, 300(2): 283-291, 2010.

FUJIMOTO, M.; NAKA, T. SOCs-1, a negative regulator of cytokine signals and TLR responses in human liver diseases. **Gastroenterology Research and Practice**, ID 470468, 2010.

GELADA, E. C. Metotrexato. **Inmunomoduladores en la enfermedad inflamatoria intestinal**, 5(2): 51-55, 2006.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, 8: 837–848, 2008.

HAN, Y-P.; TUAN, T-L.; WU, H.; HUGUES, M.; GAMER, W. L. TNF- $\alpha$  stimulates activation of pro-MMP-2 in human skin through NF- $\kappa$ B mediated induction of MT1-MMP. **Journal of Cell Science**, 114: 131-139, 2000.

HE, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, R.; ZHANG, H.; MIN, W. SOCs-1 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of ASK1-JNK inflammatory signaling by mediating ASK1 degradation. **Journal of Biological Chemistry**, 281: 5559-5566, 2006.

HOVSEPIAN, E.; PENAS, F.; SIFFO, S.; MIRKIN, GA.; GOREN, N. B. IL-10 inhibits the NF- $\kappa$ B and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCs-3 in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. **PLoS One** 8: e79445, 2013.

HOWE, L. R. & DANNENBERG, A. J. A role for cyclooxygenase-2 inhibitors in the prevention and treatment of cancer. **Seminars in Oncology**, 29(11): 111-119, 2002.

KANAREK, N.; GRIVENNIKOV, S. I.; LESHETS, M.; *et al.* Critical role for IL-1 $\beta$  in DNA damage induced mucositis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Early edition: 1-10, 2013.

KENDALL, C.; IONESCU-MATIU, I.; DREESMAN, G. R. Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Immunological Methods**, 56: 329-339, 1983.

KOLLI, V. K.; ABRAHAM, P.; ISAAC, B.; KASTHURI, N. Preclinical efficacy of melatonin to reduce methotrexate-induced oxidative stress and small intestinal damage in rats. **Digestive diseases and sciences**, 58(4): 959-69, 2013a.

KOLLI, V. K.; KANAKASABAPATHY I.; FAITH, M.; RAMAMOORTHY, H.; ISAAC, B. *et al.* A preclinical study on the protective effect of melatonin against methotrexate-induced small intestinal damage: effect mediated by attenuation of nitrosative stress, protein tyrosine nitration, and PARP activation. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, 71: 1209-1218, 2013b.

KONG, Y. Y.; BOYLE, W. J.; PENNINGER, J. M. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. **Immunology Today**, 21: 495-502, 2000.

KUBO, M.; HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. **Nature Immunology**, 4: 1169-1176, 2003.

LAINE, L. The gastrointestinal effects of nonselective NSAIDs and COX-2-selective inhibitors. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. 32(3 Suppl 1): 25-32, 2003.

LAURENCE, T. The nuclear factor NF-kappa $\beta$  pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 1(6): ID a001651, 2009.

LEE, E. Y.; SHIM, M. S.; KIM, M. J.; *et al.* Angiotensin II receptor blocker attenuates over expression of vascular endothelial growth factor in diabetic podocytes. **Experimental & Molecular Medicine**, 36(1): 65-70, 2004.

LEITÃO, R. F.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A.; MACEDO, F. D.; SILVA, L. R.; *et al.* Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, 59: 603-612, 2007.

LIANG, Y.; XU, W-D.; PENG, H.; PAN, H-F.; YE, D-Q. SOCs signaling in autoimmune diseases: Molecular mechanisms and therapeutic implications. **European Journal of Immunology**, 44: 1265-1275, 2014.

LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; YEOH, A. S. J.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. K. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, 33(5): 448-460, 2007.

MAINE, G. N.; MAO, X.; KOMARCK, CM.; BURSTEIN, E. COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappa $\beta$  subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. **EMBO Journal**, 26: 436-447, 2007.

MANICONE, A. M. & McGUIRE, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 19(1): 34-41, 2008.

MEDINA, C.; RADOMSKI, M. W. Role of Matrix Metalloproteinases in Intestinal Inflammation. **Perspectives in Pharmacology**, 318(3): .933-938, 2006.

MIYAZONO, Y.; GAO, F.; HORIE, T. Oxidative stress contributes to methotrexate induced small intestinal toxicity in rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 39: 1119-1127, 2004.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; KURODA, M.; KATADA, K.; ICHIKAWA, H.; *et al.* An orally active matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, reduces dextran sulfate sodium induced colitis in mice. **Inflammation Research**, 53: 462-468, 2004.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Role of metalloproteinases in inflammatory bowel disease. **Molecular Aspects of Medicine**, 26(4-5): 379-390, 2005.

NAKAGAWA, R.; NAKA, T.; TSUTSUI, H.; FUJIMOTO, M.; KIMURA, A. *et al.* SOCs-1 participates in negative regulation of LPS responses. **Immunity**, 17: 677-687, 2002.

NICHOLSON, S. E.; WILSON, T. A.; FARLEY, A.; *et al.* Mutational analyses of the SOCs proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. **The EMBO Journal**. 18(2): 375-385, 1999.

ONG, Z. Y.; GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; STRINGER, A. M.; DARBY, J. M.; LOGAN, R. M.; YEOH, A. S. J.; KEEFE, D. M. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. **Radiation Oncology**, 5: 22, 2010.

PARK, S. H.; KIM, K. E.; HWANG, H.; KIM, T. Y. Regulatory effect of SOCs on NF-kappa $\beta$  activity in murine monocytes/macrophages. **DNA Cell Biology**, 22: 131-139, 2003.

PETERSON, D. E.; BENSADOUN, R. J.; ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO **Clinical Practice Guidelines**, 22(6): doi: 10.1093, 2011.

PICO, J. L.; AVILA-GARAVITO, A.; NACCACHE, P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. **The Oncologist**, 3: 446-451, 1998.

PUIG, L. Metotrexato: novedades terapéuticas. **Actas Dermo-sifiliográficas**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2012.11.017>, 2013.

RAHMAN, A.; FAZAL, F. Blocking NF- $\kappa$ B: An inflammatory issue. **Proceedings of the American thoracic society**, 8: 497-503, 2011.

REFAAT, R.; SALAMA, M.; MEGUID, E. A.; EL SARHA, A.; GOWAYED, M. Evaluation of the effect of losartan and methotrexate combined therapy in adjuvant-induced arthritis in rats. **European Journal of Pharmacology**, 698: 421-428, 2013.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C. J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, 115: 1265-1275, 1995.

SANDMANN, S.; LI, J.; FRITZENKOTTER, C.; SPORMANN, J.; TIEDE, K.; *et al.* Differential effects of olmesartan and ramipril on inflammatory response after myocardial infarction in rats. **Blood Pressure**, 15: 116-128, 2006.

SEDEEK, M.; HEBERT, R. L.; KETMEDY, C. R. *et al.* Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. **Current Opinion Nephrology and Hypertension**. 18(2):122-7, 2009.

SHEN, L.; WANG, P.; GUO, J.; DU G. Anti-arthritic activity of ethanol extract of *Fagopyrum cymosum* with adjuvant-induced arthritis in rats. **Pharmaceutical biology**. 51(6): 783-9, 2013.

SOARES, P. M. G.; LOPES, L. O.; MOTA, M. S. C.; BELARMINO-FILHO, J. N.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Methotrexate-induced intestinal mucositis delays gastric emptying and gastrointestinal transit of liquids in awake rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, 48(1): 80-85, 2011.

SONIS, S. T.; PETERSON, R. L.; EDWARDS, L. J. *et al.* Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncology**. 36(4): 373-81, 2000.

SONIS, S. T. The biologic role for nuclear factor- $\kappa$ B in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with antineoplastic therapy. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(5): 380-90, 2002.

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nature Review Cancer**, 4: 277-284, 2004.

SONIS, S. T.; ELTING, L. S.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M. *et al.* Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury Pathogenesis, Measurement, Epidemiology, and Consequences for Patients. **Supplement to Cancer**, 100(9): 1995-2025, 2004.

SONIS, S.T.; O'DONNELL, K. E.; POPAT, R.; BRAGDON, C.; PHELAN, S.; *et al.* The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. **Oral Oncology**, 40: 170-176, 2004.

SOUZA, M. H.; TRONCON, L. E.; CUNHA, F. Q.; OLIVEIRA, R. B. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 36: 1383-1390, 2003.

SUKHOTNIK, I.; POLLAK, Y.; CORAN, A. G.; PILAVOT, J. BEJAR, J.; MOGILNER, J. G.; BERKOWITZ, D. Glutamine attenuates the inhibitory effect of methotrexate on TLR signaling during intestinal chemotherapy-induced mucositis in a rat. **Nutrition & Metabolism**, 11: 17, 2014.

SULTANI, M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J. Anti-Inflammatory Cytokines: Important Immunoregulatory Factors Contributing to Chemotherapy-Induced Gastrointestinal Mucositis. **Chemotherapy Research and Practice**, doi:10.1155/2012/490804, 2012.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, 42(6):1075-81, 2003.

TEWARI, K. S.; JAVA, J. J.; GATCLIFFE, T. A.; BOOKMAN, M. A.; MONK, B. J. Chemotherapy induced neutropenia as a biomarker of survival in advanced ovarian carcinoma: an exploratory study of the gynecologic oncology group. **Gynecologic Oncology**, 133: 439-445, 2014.

TOTSUKA, T.; KANAI, T.; NEMOTO, Y.; TOMITA, T.; OKAMOTO, R.; *et al.* RANKRANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4(+), CD25(+) regulatory T cells in chronic colitis. **Journal of Immunology**, 182: 6079-6087, 2009.

TOUCHEFEU, Y.; MONTASSIER, E. NIEMAN, K.; GASTINNE, T.; POTEL, G. *et al.* Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis – current evidence and potential clinical applications. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, doi:10.1111/apt.12878, 2014.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 38: 97-120, 1998.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, 92: 827-839, 2003.

VIRDIS, A.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, 12(2): 181-7, 2003.

WALTER, L.; HARPER, C.; GARG, P. Role of Matrix Metalloproteinases in Inflammation/Colitis-Associated Colon Cancer. **Immuno-Gastroenterology**. 2:1, 22-28, 2013.

WANG, X. L.; RAINWATER, D. L. VANDEBERG, J. F.; *et al.* Genetic contributions to plasma total antioxidant activity. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. 21(7): 1190-5, 2001.

WANG, D.; HU, S. S.; ZHU, J.; YUAN, J.; WU, J. J.; *et al.* Angiotensin II type 2 receptor correlates with therapeutic effects of losartan in rats with adjuvant-induced arthritis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 17: 1577-1587, 2013.

WU, Z-Q.; HAN, X-D.; WANG, Y.; *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, 68: 87-96, 2011.

YAMAMOTO, A.; ITOH, T.; NASU, R.; KAJIWARA, E.; NISHIDA, R. Sodium alginate inhibits methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 36(10) 1528–1534, 2013.

YASUFUKU, T.; SHIGEMURA, K.; TANAKA, K.; ARAKAWA, S.; MIYAKE, H.; *et al.* Risk factors for refractory febrile neutropenia in urological chemotherapy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 19: 211-216, 2013.

## 5 ANEXO



Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

**PROTOCOLO N.º 016/2013**

Professor/Pesquisador: *AURIGENA ANTUNES DE ARAÚJO*

Natal (RN), 02 de setembro de 2013.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o projeto "ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS PARA AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANALGÉSICA E ANTIINFLAMATÓRIA DA OLMESARTANA", protocolo n.º 016/2013, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: **FEVEREIRO 2015** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,

  
John Fontenele Araujo  
Coordenador da CEUA

## RESEARCH ARTICLE

# Olmesartan Decreased Levels of IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ , Down-Regulated MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK/RANKL and Up-Regulated SOCS-1 in an Intestinal Mucositis Model

Raimundo Fernandes de Araújo Júnior <sup>1,2,4\*</sup>, Maria Patrícia Oliveira da Silva Reinaldo <sup>2,4</sup>, Gerly Anne de Castro Brito <sup>3</sup>, Pedro de França Cavalcanti <sup>4,5</sup>, Marco Aurélio de Moura Freire <sup>5</sup>, Caroline Addison Xavier de Medeiros <sup>6</sup>, Aurigena Antunes de Araújo <sup>6,7,8</sup>

1. Post graduation program Health Science/Department of Morphology, UFRN, Natal, RN, Brazil, 2. Post graduation program in Functional and Structural Biology/UFRN, Natal, RN, Brazil, 3. Post graduation program in Pharmacology/Department of Morphology/UFC, Fortaleza, CE, Brazil, 4. Department of Morphology/UFRN, Natal, RN, Brazil, 5. Edmond and Lily Safra International Institute of Neuroscience of Natal (ELS-IINN), Natal, RN, Brazil, 6. Department of Biophysics and Pharmacology, UFRN, Natal, RN, Brazil, 7. Post graduation program Public Health/Department of Biophysics and Pharmacology/UFRN, Natal, RN, Brazil, 8. Post graduation program in Pharmaceutical Science/UFRN, Natal, RN, Brazil

\*araujojr@cb.ufrn.br

## Abstract

Methotrexate (MTX) is a pro-oxidant compound that depletes dihydrofolate pools and is widely used in the treatment of leukemia and other malignancies. The efficacy of methotrexate is often limited by mucositis and intestinal injury, which are major causes of morbidity in children and adults. The aim of this study was to evaluate the effect of olmesartan (OLM), an angiotensin II receptor antagonist, on an Intestinal Mucositis Model (IMM) induced by MTX in Wistar rats. IMM was induced via intraperitoneal (i.p.) administration of MTX (7 mg/kg) for three consecutive days. The animals were pre-treated with oral OLM at 0.5, 1 or 5 mg/kg or with vehicle 30 min prior to exposure to MTX. Small intestinal homogenates were assayed for levels of the IL-1 $\beta$ , IL-10 and TNF- $\alpha$  cytokines, malonaldehyde and myeloperoxidase activity. Additionally, immunohistochemical analyses of MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK/RANKL and SOCS-1 and confocal microscopy analysis of SOCS-1 expression were performed. Treatment with MTX-OLM (5 mg/kg) resulted in a reduction of mucosal inflammatory infiltration, ulcerations, vasodilatation and hemorrhagic areas (p,0.05) as well as reduced concentrations of MPO (p,0.001) and the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  (p,0.001) and TNF- $\alpha$  (p,0.01), and increase anti-inflammatory cytokine IL-10 (p,0.05). Additionally, the combined treatment reduced expression of MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK and RANKL(p,0.05) and increased cytoplasmic expression of SOCS-1 (p,0.05). Our findings confirm the involvement of OLM in reducing the inflammatory response through increased immunosuppressive signalling in an IMM. We also suggest that the beneficial effect of olmesartan treatment is specifically exerted during the damage through blocking inflammatory cytokines.

## OPEN ACCESS

Citation: Araújo Júnior RF, da Silva Reinaldo MPO, Brito GAdC, Cavalcanti PdF, Freire MAdM, *et al.* (2014) Olmesartan Decreased Levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , Down-Regulated MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK/RANKL and Up-Regulated SOCS-1 in an Intestinal Mucositis Model. PLoS ONE 9(12): e114923. doi:10.1371/journal.pone.0114923.

Editor: Zoran Culig, Innsbruck Medical University, Austria

Received: June 23, 2014

Accepted: November 15, 2014

Published: December 22, 2014

**Copyright:** © 2014 Araújo Júnior *et al.* This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

**Funding:** CNPq Universal Notice n. 47.6996/2013. MAMF and PFC wish to thank Alberto Santos Dumont Association for Research Support (AASDAP), Financier of Studies and Projects (FINEP), and National Institute Brain Machine Interface (INCEMAQ) (INCTs Program CNPq/MCT) for financial support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Oral and gastrointestinal mucositis are common complications of chemotherapy, in particular with drugs affecting DNA synthesis (S-phase-specific agents such as fluorouracil, methotrexate, and cytarabine). Mucositis occurs in 40% of patients after standard dose chemotherapy, and in 100% of patients undergoing high dose chemotherapy and stem cell or bone marrow transplantation and contributes not only to the morbidity of treatment but also to its cost [1]. The pathogenesis of chemotherapy induced gastrointestinal mucositis includes five phases: initiation by chemotherapy, up-regulation and generation of messenger signals, signaling by pro-inflammatory cytokines and amplification of mucosal injury, ulceration of the mucosa and finally, healing. The initial stages of inflammation in mucositis include increased pro-inflammatory cytokine levels, which act as a homing marker for inflammatory immune cells in the submucosa [2].

Methotrexate (2,4-diamino-N10-methyl propylglutamic acid, MTX) is one of the most widely studied therapeutics agents available to treat many solid tumors, hematologic malignancies, and autoimmune diseases [3]. MTX acts as a cancer chemotherapeutic agent by inhibiting dihydrofolate reductase (DHFR) with high affinity, resulting in depletion of tetrahydrofolates that are required for the synthesis of DNA and RNA [4]. However, in addition to cancer cells being affected by MTX, rapid proliferating cells such as bone marrow and gastrointestinal cells are also affected. One of the most important side effects of MTX is related to the gastrointestinal tract. [5, 6].

Mucositis is typically accompanied by oral and/or abdominal pain, ulceration, dysphagia, and diarrhea, which often result in communication impairment, reduction in fluid and food intake, and consequent dehydration and weight loss [7].

The use of bioactive/growth factors, hormones or interleukins to modify epithelial metabolism and reduce the susceptibility of the tract to mucositis [8]. Some of these treatments appear to have considerable potential and are at present under clinical evaluation. Presently available treatments do not prevent mucositis, but can limit its severity if used in combination.

Cancer patients may have systemic diseases, as hypertension arterial, that are treated in parallel to chemotherapy, and that can mitigate or aggravate the adverse effects of chemotherapy during treatment [9]. Our group has studied the angiotensin II receptor blocker (ARB). For example, the angiotensin II receptor blocker (ARB) has been implicated as an anti-inflammatory agent that suppresses tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced activation of nuclear factor (NF)- $\kappa\beta$  in vascular endothelial cells [10]. In experimental model, Telmisartan, angiotensin II receptor blocker (ARB), reduced markers of inflammation, proteases and changed proteins involved in bone remodeling [11]. Similar results were obtained in a study using another ARB, olmesartan [12].

The goal of this study was show anti-inflammatory activity of olmesartan in model experimental mucositis intestinal.

## Materials and Methods

### Chemicals

Methotrexate was purchased from LIBBs Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brazil. Olmesartan medoximil (Benicar 20 mg, Daiichi Sankyo Brazil Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brazil), O-Dianisine Sigma (São Paulo, Brazil), antibodies (Santa Cruz Biotechnology, INTERPRISE, Brazil): COX-2; MMP-2; MMP-9; RANK; RANKL; SOCS-1, Streptavidin-HRP-conjugated secondary antibody (Biocare Medical, Concord, CA, USA). TrekAvidin-HRP Label + Kit from Biocare Medical, Dako, USA. IL-1 $\beta$ , IL 10, TNF- $\alpha$  ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

### Animals

Experiments were performed on male Wistar albino rats weighing between 250 and 300 g, purchased from Bioterio Department of Biophysical and Pharmacology. Animals were housed in a temperature and humidity controlled environment under a 12-h light/dark cycle (lights on at 6 AM). Food and water were available ad libitum. The animals used in the experiments originated from the Department of Biophysics and Pharmacology. The animals were housed individually in polypropylene cages measuring 41x34x16 cm Autoclaved. Various signals of the health of the animals were monitored, including: coat condition, response to stimuli, faeces and urine. Only those animals in perfect health were kept in the experiment. Standard diet (Basic Composition: Soybean meal, dextrin, rice husks, wheat bran, rice bran, meat meal, fish meal, sodium chloride, magnesium oxide, iron sulfate, copper sulfate, manganese monoxide, zinc oxide, calcium iodate, cobalt sulphate, sodium selenite, vitamin A, vitamin D3, vitamin E, vitamin K3, vitamin B1, vitamin B2, niacin, pantothenic acid, vitamin B6, folic acid, biotin, vitamin B12, choline chloride, lysine, methionine, propionic acid, *Agrobacterium tumefaciens*, and *Bacillus thuringiensis*; Presence/Evalis do Brasil Nutrição Animal LTDA, São Paulo) and water source (bottled). The National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals were followed. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering degree. The methods used in this investigation were approved by CEUA/UFRN (approval number: 016/2013).

### Induction of experimental intestinal mucositis

Eighty rats were randomly divided into eight groups (five animals per group, duplicate groups). The vehicle control group received normal saline orally by gastric gavage and i.p. saline (0.9% NaCl) for 3 days. The positive control group received saline orally by gastric gavage and i.p. MTX (7 mg/kg) for 3 days. Three groups received oral OLM at 0.5, 1 and 5 mg/kg, respectively, by gastric gavage and i.p. saline (0.9% NaCl) for 3 days. Three additional groups received oral OLM at 0.5, 1 and 5 mg/kg, respectively, by gastric gavage and i.p. MTX (7 mg/kg) for 3 days. Animals were euthanized on the fourth day with (80 mg/kg, i.p.) 2% thiopental (Cristália, São Paulo, Brazil).

Following euthanasia, a cardiac puncture was performed and blood samples were taken for leukogram, bacteremia and biochemical analyses. The small intestines of the rats were frozen at - 80°C for analyses of cytokine, myeloperoxidase (MPO) and

malonyldialdehyde levels. Intestines were immersed in 10% buffered formalin for histopathological analysis.

### **Myeloperoxidase (MPO) assay**

The extent of neutrophil accumulation in the small intestine samples was measured by assaying MPO activity. Intestinal mucosa (duodenum, three samples per group; jejunum, four samples per group; ileum, three samples per group) were harvested as described above and stored at - 70°C until required for assay. After homogenisation and centrifugation (2000xg for 20 min), MPO activity was determined by a previously described colorimetric method [13]. Results are reported as units of MPO per gram of tissue.

### **Malonyldialdehyde (MDA) assay**

Malonyldialdehyde (MDA) is an end product of lipid peroxidation. To quantify the increase in free radicals in intestinal tissue samples, MDA content was measured via the assay described by Esterbauer and Cheeseman [14]. Samples (duodenum, three samples per group; jejunum, four samples per group; ileum, three samples per group) were suspended in buffer Tris HCl 1:5 (w/v) and minced with scissors for 15 sec on an ice-cold plate. The resulting suspension was homogenised for 2 min with an automatic Potter homogenizer and centrifuged at 2500xg at 4°C for 10 min. The supernatants were assayed to determine MDA content. The results are expressed as nanomoles of MDA per gram of tissue.

### **IL-1 $\beta$ , IL-10, and TNF- $\alpha$ assay**

The intestinal tissue samples (duodenum, three samples per group; jejunum, four samples per group; ileum, three samples per group) were stored at - 70°C until use. The tissue was homogenised and processed as described by Safieh-Garabedian, *et al* (1995) [15]. Levels of IL-1 $\beta$  (detection range: 62.5–4000 pg/mL; sensitivity or lower limit of detection [LLD]: 12.5 ng/mL of recombinant mouse IL-1 $\beta$ ), IL-10 (detection range: 62.5–4000 pg/mL; sensitivity or LLD: 12.5 ng/mL of recombinant mouse IL-10) and TNF- $\alpha$  (detection range: 62.5–4000 pg/mL; sensitivity or LLD: 50 ng/mL of recombinant mouse TNF- $\alpha$ ) in the intestinal samples were determined with a commercial ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), as described previously [16]. All samples were within the wavelength used in UV-VIS spectrophotometry (absorbance measured at 490 nm).

### **Leukogram**

Animals were anesthetized on day 4 with 2% thiopental (80 mg/kg, i.p.), and a blood sample was collected via heart puncture. Then, 20  $\mu$ l of blood were added to 380  $\mu$ l of Turk's solution. The total and differential counts of leukocytes were obtained by standard manual procedures using light microscopy [17]. The results are expressed as the number of cells per milliliter (ml).

## **Bacteremia**

On day 4, blood samples were collected via heart puncture under sterile conditions. Ten microlitres of blood were diluted tenfold in brain–heart infusion (BHI) medium. Bacterial growth was analysed after 24–48 h at 37°C by visual analysis of the turbidity of the culture medium. A turbid medium indicates bacteremia (+), and a non-turbid medium suggests absence of bacteria in the blood. Organisms that grew on BHI medium were streaked for isolation on 5% sheep blood agar plates, MacConkey agar plates and mannitol-salt-agar plates. Organisms that grew were identified by standard methods, including Gram stain morphology, DNase, catalase, coagulase, motility, sugar metabolism analyses.

## **Histopathological analysis**

The small intestines were excised quickly and washed with cold isotonic saline. Each segment was weighed and cut longitudinally. Three sections of small intestine (five animals per group) were analyzed. The specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 5 mm thickness were obtained for hematoxylin–eosin staining (H&E) and examined by light microscopy (40x, Olympus BX50, Morphology Department/UFRN). The parameters of inflammatory cell infiltration, vasodilatation, and the presence of hemorrhagic areas, edema, ulcerations and abscesses were determined in a single-blind fashion and graded as follows: Score 1 – normal epithelium and connective tissue without vasodilatation; absence of or discreet cellular infiltration; and absence of hemorrhagic areas, ulcerations or abscesses; Score 2 - discreet vasodilatation and areas of re-epithelisation; discreet inflammatory infiltration with mononuclear prevalence; and absence of hemorrhagic areas, edema, ulcerations or abscesses; Score 3 – moderate vasodilatation, areas of hydropic epithelial degeneration; inflammatory infiltration with neutrophil prevalence; and presence of hemorrhagic areas, edema and eventual ulcerations, and absence of abscesses; and Score 4 - severe vasodilatation; inflammatory infiltration with neutrophil prevalence; and presence of hemorrhagic areas, edema, ulcerations, and abscesses [18].

## **Immunohistochemical analysis of MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK, RANKL and SOCS-1**

Thin sections of jejunum (4 µm) were obtained from each group (negative control, MTX and MTX-OLM 5 mg/kg) with a microtome and transferred to gelatine-coated slides. Each tissue section was then deparaffinised and rehydrated. The intestinal tissue slices were washed with 0.3% Triton X-100 in phosphate buffer (PB) and quenched with endogenous peroxidase (3% hydrogen peroxide). Tissue sections were incubated overnight at 4°C with 1:400 dilutions of primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, INTERPRISE, Brazil) against COX-2, MMP-2, MMP-9, SOCS-1, RANK and RANKL. Dilution tests (3 dilutions) were performed with all antibodies to identify the 1:400 dilution as appropriate. Slices were washed with phosphate buffer and incubated with a streptavidin/HRPconjugated secondary antibody (Biocare Medical, Concord, CA, USA) for 30 minutes. Immunoreactivity to the various proteins was visualised with a colorimetric-based detection kit following the protocol provided by the manufacturer (TrekAvidin-HRP Label + Kit from Biocare Medical, Dako, USA). Sections were counter-stained with hematoxylin. Known positive controls and negative

controls were included in each set of samples. Planimetry microscopy (Olympus BX50, Morphology Department/UFRN) with a high-power objective (40x) was utilised to score the intensity of cell immunostaining: 1= absence of positive cells; 2= small number of positive cells or isolated cells; 3= moderate number of positive cells; and 4= large number of positive cells. Labelling intensity was evaluated by two previously trained examiners in a double-blind fashion. Three tissue sections per animal (five animals per group) were evaluated.

### **Analysis for confocal immunofluorescence**

Three sections per animal (five animals per group) were immunostained with fluorescently labelled antibodies to reveal the SOCS-1 reactivity pattern. Briefly, sections were removed from the freezer, brought to room temperature for 10 min and washed for 10 minutes in PB. They were pre-treated for 25 min in 60°C 0.2 M boric acid (pH 9.0). Sections were cooled for about 20 min and washed in 0.1 M PB-Tween for 10 minutes (2x5 minutes), followed by incubation in 10% normal goat serum (Vector Laboratories, USA) for 30 minutes. The sections were incubated overnight with rabbit SOCS-1 primary antibody (1:400 in 1% normal goat serum; Santa Cruz Biotechnology, USA) at 18°C, washed in 0.1 M PB-T for 10 minutes (2x5 minutes) and incubated with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:700 in 0.1 M PB, Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Finally, the sections were mounted using Vectashield mounting medium for fluorescence (DAPI/Antifade solution, Vector Laboratories, USA). Fluorescent images were obtained on a Carl Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM 710, 20x and 63x objectives, Carl Zeiss, Jena, Germany, Edmond and Lily Safra International Institute of Neuroscience of Natal, Brazil).

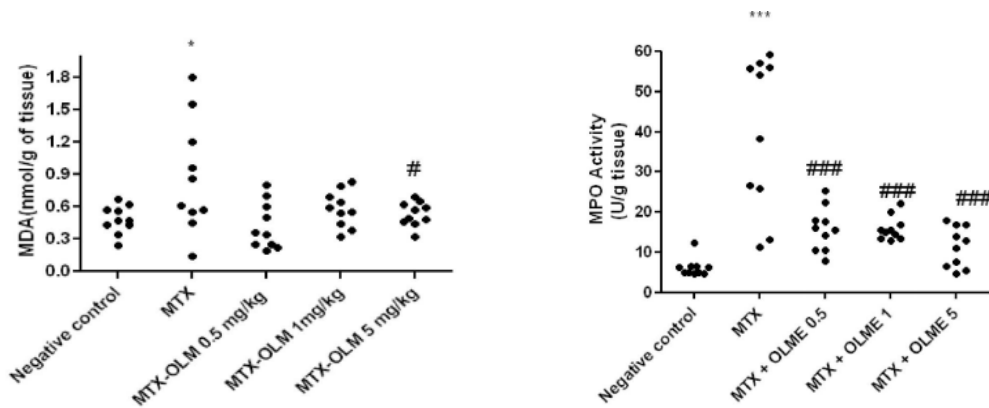
Known positive and negative controls were included in each batch of samples. Tissue reactivity in all groups (negative control, MTX and MTX-OLM 5 mg/kg) was assessed by computerised densitometry analysis using digital images captured with the confocal microscope. Average densitometric values were obtained using the **ImageJ** software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Measurements were obtained from a 0.02 mm<sup>2</sup> square window positioned across the regions of interest (mucosa, three samples per animal). To minimize the effects of within-group variability, we utilised a normalized scale based on the underlying muscle layer (averaged over measurements of three different sites using the same window). For every animal, the average optical density (OD) for the regions of interest (mucosa) was designated R. The OD of the underlying muscle layer was designated L. To compare SOX reactivity between all three groups, a contrast index was calculated according to the equation:  $C = (R - L)/(R + L)$  (modified from Freire *et al*) [19].

### **Statistical analysis**

Data are presented as means with standard errors of the mean (SEMs) or as medians, when appropriate. Analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test was used to calculate the means. The Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test was used to compare medians (GraphPad Prism 5.0 Software, La Jolla, CA, USA). A p-value of <0.05 indicated a statistically significant difference.

## Results

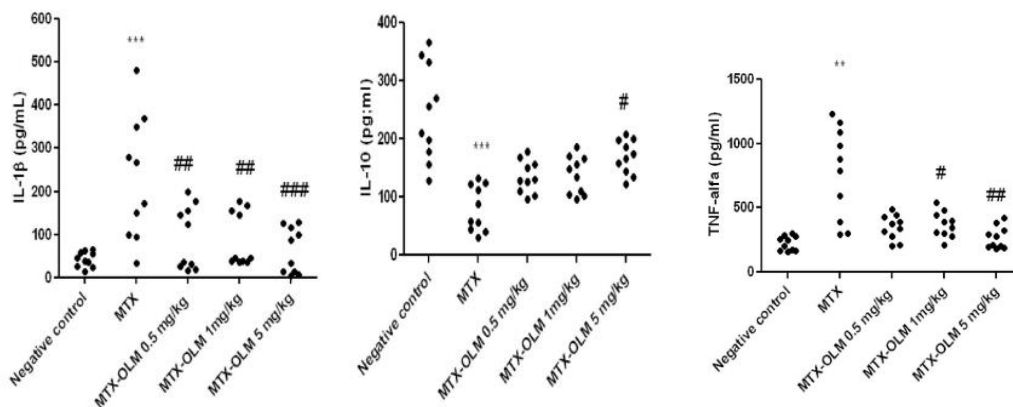
Myeloperoxidase and malonyldialdehyde activity MPO activity was measured in the small intestine tissue. The MTX alone group had significantly greater MPO and MDA than the Negative control ( $p < .001$  and  $p < 0.5$ , respectively). Levels of MPO in all olmesartan treatment groups with MTX were significantly decreased ( $p < 0.001$ ) compared to the MTX alone group. Levels of MDA in Negative control and MTX-OLM 5 mg/kg were significantly decreased ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1).



**Fig. 1.** OLM attenuates MTX effects on MPO and MDA. The MTX alone group had significantly greater MPO and MDA than the Negative control (\*\* $p < .001$  and \* $p < 0.5$ , respectively). All three doses of OLM (0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg) countered the MTX effect on MPO significantly (### $p < .001$  vs. MTX). Although all doses of OLM appeared to reduce MDA subjectively, only the highest dose (5 mg/kg) produced a significant difference versus the MTX alone group (# $p < .05$ ). Segments of duodenum, jejunum and ileum/ Duplicate Experiments.

## Effect of treatment on levels of IL-1 $\beta$ , IL-10 and TNF- $\alpha$ inflammatory activity

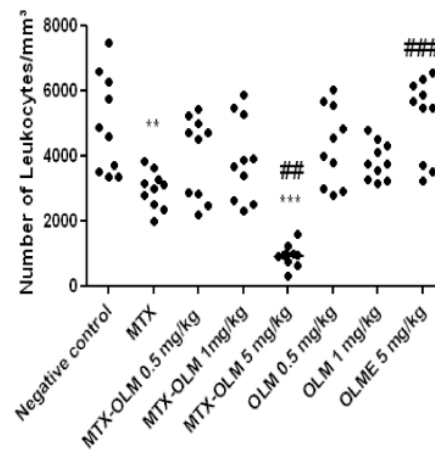
MTX elevated levels of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.001$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ), while reducing IL-10 levels ( $p < 0.001$ ) than the Negative control. The IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels were decreased in the MTX-OLM 5 mg/kg ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ ), MTX-OLM 1 mg/kg ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively). Levels of IL-1 $\beta$  were significantly decreased in the MTX-OLM 0.5 mg/kg ( $p < 0.001$ ) group, compared to the MTX group. Levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 differ significantly between the MTX-OLM 5 mg/kg group and the MTX group,  $p < .05$  (Fig. 2).



**Fig. 2.** OLM opposes MTX influence on cytokines. MTX elevated levels of IL-1 $\beta$  (\*\* $p$ <0.001) and TNF- $\alpha$  (\*\* $p$ <0.01), while reducing IL-10 levels (\*\* $p$ <0.001) than the Negative control. OLM had dose-dependent MTX-countering effects on IL-1 $\beta$  (0.5 mg/kg, 1 mg/kg ### $p$ <0.01 and 5 mg/kg ###  $p$ <0.001) and TNF- $\alpha$  (1 mg/kg # $p$ <0.05 and 5 mg/kg ##  $p$ <0.01), but only OLM 5 mg/kg a significant MTX-countering effect on IL-10 levels (# $p$ <0.05). Segments of duodenum, jejunum and ileum/Duplicate Experiments.

## Effects of OLM on leukocytosis and bacteremia

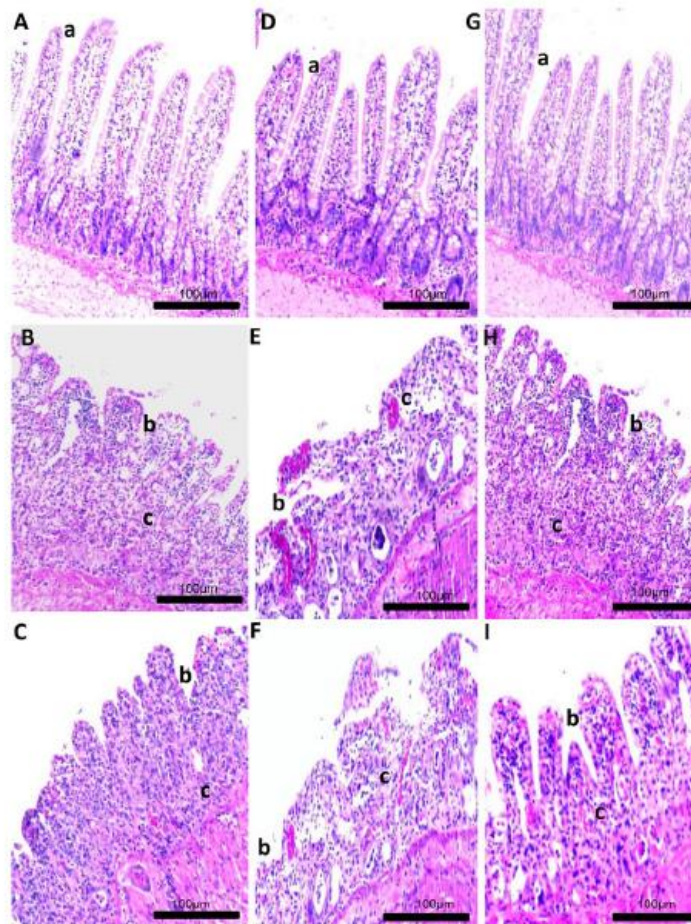
We observed significant leukopenia in animals treated with MTX ( $p$ <0.001) and MTX OLM 5 mg/kg ( $p$ <0.001, Fig. 3) with number of leukocytes less than 2000/ mm<sup>3</sup> cells, indeed, the MTX-OLM 5 mg/kg resulted in an even stronger reduction effect than MTX alone (### $p$ <.01 vs. MTX). OLM 5 mg/kg increased leukocyte density significantly (### $p$ <.001 vs. MTX), Fig. 3. The blood culture results were negative for all groups, indicating the absence of bacteremia (data not shown).



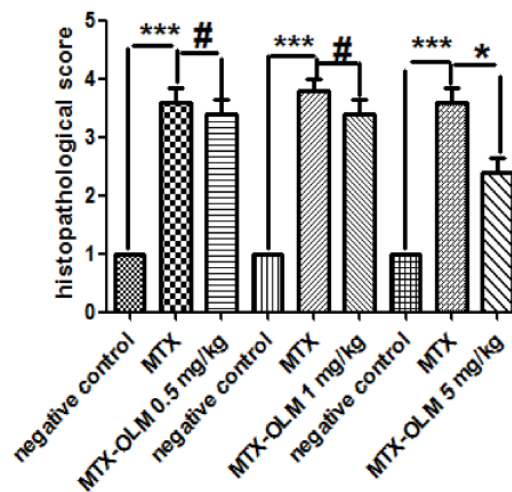
**Fig. 3.** MTX and OLM effects on leukocyte density. MTX alone and MTX-OLM 5 mg/kg reduced leukocyte density (\*\* $p$ <.001 and \*\*\*  $p$ <0.001, respectively vs. Negative control), indeed, the and MTX-OLM 5 mg/kg resulted in an even stronger reduction effect than MTX alone (### $p$ <.01 vs. MTX). OLM 5 mg/kg increased leukocyte density significantly (### $p$ <.001 vs. MTX).

## Histological analysis

MTX-treated animals histologically exhibited significant loss of crypt architecture and signs of crypt remodelling, severe villous epithelial atrophy, degeneration and shortening of the villus, and polymorphonuclear leukocyte infiltration in the lamina propria. Histological damage was initially assessed in the jejunum with a semi-quantitative score. Intestinal damage was reduced in animals treated with MTX-OLM 5 mg/kg ( $p$ <0.05, Figs. 4 I and 5) compared with animals that received mg/kg MTX-OLM 0.5 or 1 mg/kg ( $p$ >0.05, Fig. 4 C and F, respectively and Fig. 5). These results were histopathologically obvious in the MTX-OLM 5 mg/kg group, which exhibited reduced tissue damage, preserved areas of the villus, and reductions of cellular infiltration and areas of hemorrhage or ulceration.



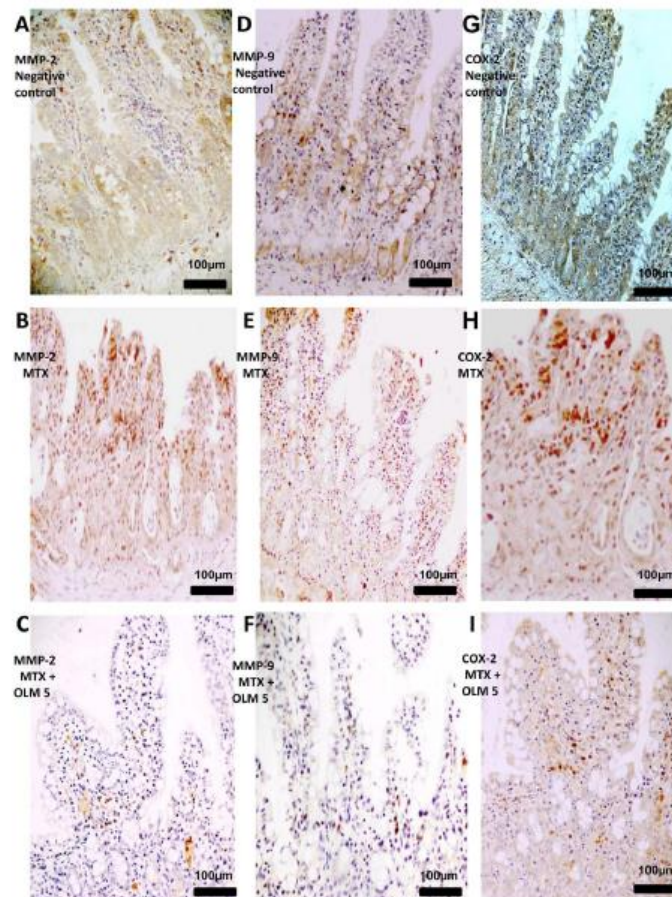
**Fig. 4.** Histological examination of jejunum specimens. For each group, 5 animals were used, and three H&E sections from each animal were analyzed. Representative samples from each OLM treatment group are shown with graphs summarizing the group's mean histopathological score. Images and data from the low, middle, and high OLM dose groups are shown in panels A–C; D–F; G–I respectively (micrograph key: a, villus height; b, reduction of villus; c, inflammatory infiltrate). Control group slides are shown in A, D, and G (upper left image in each group). MTX alone group slides are shown in panels B, E, and H (middle images). Note that the MTX alone rats' jejunum exhibited intestinal mucositis with loss of crypt architecture, severe villous epithelial atrophy, degeneration and shortening of the villus length, and polymorphonuclear leukocyte infiltration in the lamina propria. Damage in mucosa as intense inflammation and villous epithelial atrophy persisted in the MTX-OLM 0.5 mg/kg (C) and MTX-OLM 1 mg/kg (F) groups (#  $p > .05$  vs. MTX). (I) Conversely, reduced inflammation, reepithelization with decreased vasodilatation, decreased cellular infiltration, and reduction of hemorrhagic areas, ulcerations, and abscesses were observed in the jejunum from animals treated with MTX-OLM 5 mg/kg for 3 d. Magnification 20x, scale bar = 100  $\mu$ m.



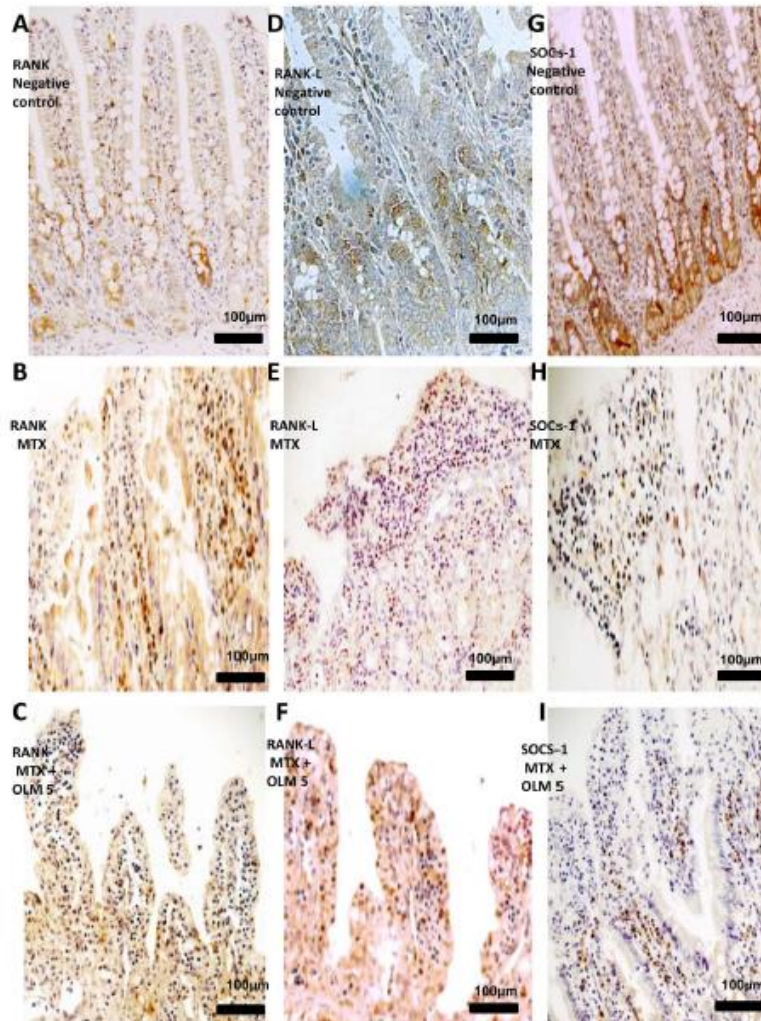
**Fig. 5. Effect of OLM treatment on intestinal damage in rats.** For each group, 5 animals were used, and three H&E sections from each animal were analyzed. Representative samples from each OLM treatment group are shown with graphs summarizing the group's mean histopathological score. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (Compared to negative control \*\*\* $p < 0.001$ , compared to MTX \* $p < 0.05$ ; compared to MTX # $p > 0.05$ ).

### Immunohistochemical analysis

We investigated expression levels of MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK/RANKL and SOCS-1 in rat intestinal tissues from the negative control, MTX, and MTX-OLM 5 mg/kg groups using immunohistochemistry. The jejunal tissue showed differences in immunohistochemical markers among the groups. Compared to the MTX group, the MTX-OLM 5 mg/kg group exhibited reductions in the levels of MMP-2, MMP-9 (Fig. 6 A,B,C and D,E,F, respectively), COX-2, RANK (Fig. 6 G,H,I and Fig. 7 A,B,C, respectively) and RANKL (Fig. 7 D,E,F) and an increase in the expression the immunosuppressive protein SOCS-1 (Fig. 7 G,H,I). There was a decrease in immunohistochemical scores of MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK and RANK-L of group OLM-MTX 5 mg/kg compared to MTX (all,  $p < 0.05$  Fig. 8 A,B,C,D and E, respectively) and an increase in immunohistochemical scores of SOCS of MTX -OLM 5 mg/kg group compared to MTX ( $p < 0.05$  Fig. 8 F).



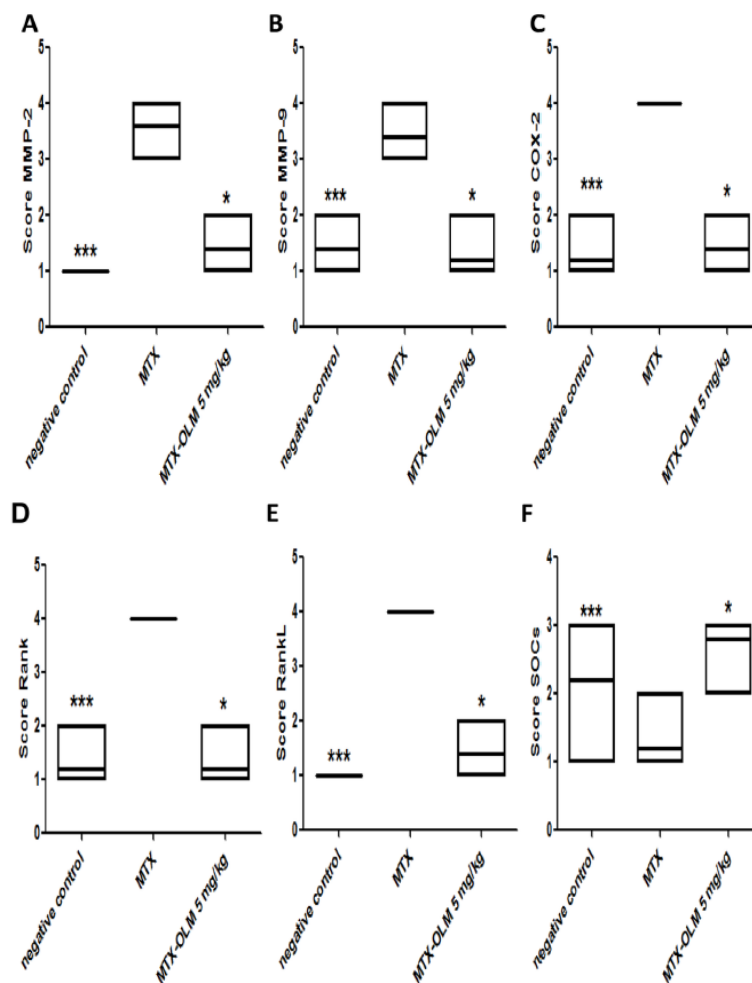
**Fig. 6. IHC examination of jejunum specimens.** For each antigen, three immunolabeled sections were analyzed per animal (N=5/group). Generally, jejunum from MTX rats had greater MMP-2 (A–C), MMP-9 (D–F) and COX-2 (G–I) immunoreactivity. Magnification 40x, scale bar =100 µm.



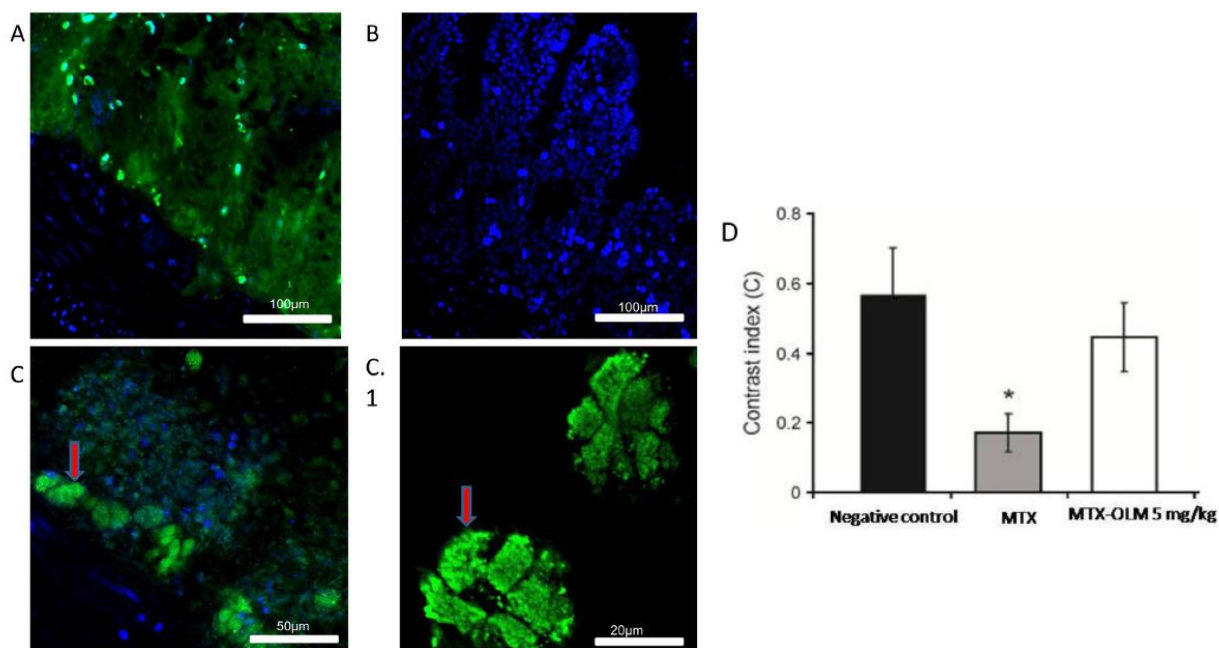
**Fig. 7. IHC examination of jejunum specimens.** For each antigen, three immunolabeled sections were analyzed per animal (N=5/group). Generally, jejunum from MTX rats had greater RANK (A–C), and RANK-L (D–F) immunoreactivity and reduced SOCS (G–I) immunoreactivity. Magnification 40x, scale bar =100  $\mu$ m.

### Confocal immunofluorescence

We observed differences between the cellular localization of the SOCS-1 protein in the negative control, MTX, and MTX-OLM 5 mg/kg groups. The SOCS-1 signal was strongly cytoplasmic (green) in the cells of the group treated with MTX-OLM 5 mg/kg (Fig. 9C and C1), moderately diffuse (green) in all mucosal layers in the negative control group (Fig. 9A), and absent (blue) in the MTX group (Fig. 9B).



**Fig. 8. Effect of OLM treatment on intestinal damage in rats.** For each group, 5 animals were used, and three immunohistochemistry sections from each animal were analyzed. Representative samples from MTX-OLM 5 mg/Kg treatment group are shown with graphs summarizing the group's mean score, showing immunoreactivity to MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK, RANK-L, and SOCs. Note that these effects were reversed (i.e. normalized) in the MTX- OLM 5 mg/kg group's jejunum. \* $p < .05$  vs MTX and \*\*\* $p < .001$  negative control vs. MTX, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test.



**Fig. 9. OLM reverses MTX-induced suppression of SOCS-1 protein expression.** Representative confocal photomicrographs of SOCS-1 immunoreactivity (green) in jejunum from each group. The sections are nuclear counterstained with DAPI (blue). (A) negative control rat jejunum had moderately diffuse SOCS-1 labeling in all mucosa layers, 20x. (B) SOCS-1 labeling was absent in the MTX intestinal mucositis group, 20x. (C, C.1) Strong cytoplasmic SOCS-1 labeling (red arrows) was seen in the group treated with MTX-OLM 5 mg/kg, 20x and scale bar 50  $\mu$ m and, 63x and scale bar 20  $\mu$ m, respectively. (D) Densitometric analysis confirmed a significant reduction in SOCS-1 immunoreactivity in the MTX group that was blocked in the MTX-OLM 5 mg/kg group (\* $p < .05$ , Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

## Discussion

Mucositis is an important side effect of MTX therapy. There is no definitive prophylaxis or treatment for mucositis, due in part to a lack of understanding of its pathogenesis and its impact on intestinal structure and function. We used an intestinal mucositis model to analyse the behaviour of the inflammatory process in the presence of an ARB, olmesartan. The anti-inflammatory benefit of the combined use of an immunosuppressive agent (e.g., MTX) with an ARB was previously observed in two experimental models of arthritis [20, 21].

Microscopic signs of intestinal mucositis were observed in the MTX-treated group, including marked detachment of surface epithelium, potentially due to stromal edema. Additional signs of mucosal damage, including distortion, fusion, shortening and blunting of villi, were observed in rats subjected to MTX treatment, and were associated with a significant decrease in villus height. These changes are consistent with a previous report by Boukhattala, et al [22]. Our histopathological data demonstrated a significant reduction in the presence of these inflammatory markers in the rats treated with MTX- OLM 5 mg/kg. Significant increases in the villus height were observed in the MTX-OLM 5 mg/kg group, compared to the positive control (MTX), suggesting a reduction in intestinal damage in the rats treated with OLM.

We observed an increase in MPO activity in all intestine segments, suggesting participation of neutrophil infiltration in MTX-induced intestinal mucositis, consistent with previous literature. Miyazono et al [23] demonstrated that neutrophil infiltration plays an important role in MTX-induced damage of the small intestine in rats. The inflammatory phase of chemotherapy-induced mucositis is initiated by a disruption in DNA synthesis, which impairs metabolism in the rapidly dividing progenitor cells of the epithelia. This can lead to mitotic inhibition, disruption of cell and cell-substratum interactions, and a slight reduction in epithelial integrity. After these events, pro-inflammatory cytokine levels increase, followed by neutrophil infiltration [24]. We observed a significant reduction in tissue levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , important markers of inflammation following treatment with OLM. Further, previous studies have demonstrated the anti-inflammatory activity of OLM in reducing the levels of these cytokines [12, 25].

Increased levels of pro-inflammatory cytokines, ROS and cyclooxygenase-2 (COX-2) lead to mucosal injury. Increased COX-2 activity in 5-FU- and radiation-induced mucositis suggests an important role for COX-2 in the pathogenesis of oral mucositis [26, 27]. We found that COX-2 activity was increased in the MTX-treated group and decreased in the MTX-OLM 5 mg/kg group.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are produced in the GI tract by several structural cells. MMPs are a class of structurally related proteins that are collectively responsible for the metabolism of the extracellular matrix (ECM) of the connective tissue [28]. These zinc- and calcium-dependent endopeptidases degrade most ECM

components. They are involved in the remodelling and degradation of matrix components, such as collagen, proteoglycans, and glycoproteins [29].

TNF- $\alpha$  is one of the most important inducers of MMP production. MMPs have been found in inflamed tissues of patients with inflammatory bowel disease, suggesting a role for these enzymes in the increased proteolysis of the mucosa, leading to ulceration, inflammation, and fistula formation [30]. We observed decreased tissue staining for MMP-2 and MMP-9 in the group that was treated with MTX-OLM 5 mg/kg. This finding reflects a reduction in the proteolysis of the mucosa that can lead to ulceration and inflammation of the intestinal tissue.

The opposite effect was observed in the MTX group. Increases in MMP-2, -3, -9 and -12 expression have been associated with inflammatory infiltration and increased tissue damage [31].

Given the role of suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) in inhibition of cytokine-mediated signalling, one of the most representative functions of SOCS-1 is to regulate the signalling activated by TLR signalling-induced cytokines [32].

We observed a decrease in the tissue staining of SOCS-1 in the positive control group (MTX), whereas the tissue staining was increased in the group treated with OLM. This finding can be explained by the negative regulatory role of SOCS-1 in the production of pro-inflammatory cytokines. Treatment with MTX-OLM 5 mg/kg stimulates the anti-inflammatory activity of SOCS. Macrophages lacking SOCS-1 have been shown to be hypersensitive to LPS, leading to increased production of pro-inflammatory cytokines [33].

SOCS-1, also called SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) and JAB-1 (JAK binding protein-1) is an intracellular negative-feedback regulator. SOCS-1 inhibits over activation of the JAK-STAT (Janus kinase-signal transducers and activators of transcription) signalling pathway of cytokines by binding to and inhibiting activated JAKs [34]. He et al. showed that SOCS-1 can inhibit TNF- $\alpha$ -induced JNK activation in endothelial cells [35].

Regulatory T (TR) cells play a central role in the maintenance of immunological homeostasis. Specific molecular mechanisms control the function of TR cells in the intestine to suppress intestinal inflammation. TR cells preferentially express a TNF family member, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL), that blocks the signalling pathway via RANKL and the receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) [36]. Totsuka *et al.* showed that the RANK-RANKL signalling pathway is critically involved in regulating the function of TR cells in colitis [37]. Cytoplasmic SOCS-1 has been hypothesised to regulate the transcription factor NF- $\kappa$ B [38]. In our study, we observed an increase in RANK/RANKL expression in the group treated with MTX-OLM 5 mg/kg compared to the MTX group. Presumably, this response is an attempt to regulate the immune response and reduce the inflammatory process.

The group treated with MTX-OLM 5 mg/kg displayed a high level of cytoplasmic expression of SOCS, indicating negative regulatory action on the RANK/RANKL complex that will prevent the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and the production of pro-inflammatory cytokines [39].

One of the disadvantages of chemotherapy is the adverse effect on cells with high mitotic capacity, such as bone marrow cells, and leukopenia is a commonly observed adverse effects of chemotherapy [40, 41]. Our data indicate that the interaction between olmesartan and methotrexate worsened the leukopenia caused by the methotrexate, an effect which may predispose patients to infectious disease. Our findings draw attention to this drug interaction, which has not been reported in the

literature, and suggest the importance of careful monitoring of patients on this combination of medications.

Based on these findings, we hypothesise that the beneficial effect of olmesartana treatment is specifically exerted during the damage through blocking inflammatory cytokines in intestinal mucositis.

In summary, MTX inhibits the SOCS-1 signalling pathway, whereas OLM improves intestinal recovery and attenuates the inhibitory effect of MTX on SOCS-1. Specifically, OLM treatment reduces expression of the cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , down regulates expression of COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/ RANK, and up regulates expression of SOCS-1. The positive effect of OLM on intestinal structure in intestinal mucositis suggests that OLM treatment may aid in the recovery of oncologic patients receiving chemotherapy, provided the patient is carefully monitored.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RFAJ AAA. Performed the experiments: RFAJ MPOSR PFC MAMF AAA. Analyzed the data: RFAJ GACB CAXM AAA. Contributed reagents/materials/analysis tools: RFAJ GACB MAMF AAA. Wrote the paper: RFAJ AAA. Animal Experiment: AAA MPOSR RFAJ. Assays of MPO, MDA and Cytocines: RFAJ AAA GACB CAXM. Histopathological and immunohistochemistry analysis: RFAJ MPOSR. Confocal microscopic: RFAJ PFC MAMF.

### References

1. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, et al. (2004) Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 100: 1995–2025.
2. Sonis ST (2004) The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 4: 277–284.
3. Purcell WT, Ettinger DS (2003) Novel antifolate drugs. *Curr Oncol Rep* 5: 114–125.
4. Chan ES, Cronstein BN (2013) Mechanisms of action of methotrexate. *Bull Hosp Jt Dis* (2013) 71 Suppl 1: S5–8.
5. Gulgun M, Erdem O, Oztas E, Kesik V, Balamtekin N, et al. (2010) Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol* 62: 109–115.
6. McKendry RJ, Dale P (1993) Adverse effects of low dose methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 20: 1850–1856.
7. Avritscher EB, Cooksley CD, Elting LS (2004) Scope and epidemiology of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Semin Oncol Nurs* 20: 3–10.
8. Drucker DJ (2002) Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology* 122: 531–544.
9. Rahimtoola SH (2008) The diagnosis and management of cardiovascular disease in cancer patients. Foreword. *Curr Probl Cardiol* 33: 159.
10. Nakano A, Hattori Y, Aoki C, Jojima T, Kasai K (2009) Telmisartan inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappaB activation independently of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Hypertens Res* 32: 765–769.
11. Araujo AA, Souza TO, Moura LM, Brito GA, Aragao KS, et al. (2013) Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF-alpha, down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *J Clin Periodontol* 40: 1104–1111.
12. Araujo AA, Lopes de Souza G, Souza TO, de Castro Brito GA, Saboia Aragao K, et al. (2013) Olmesartan decreases IL-1beta and TNF-alpha levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386: 875–884.
13. Souza MH, Troncon LE, Cunha FQ, Oliveira RB (2003) Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 1383–1390.

14. Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186: 407–421.
15. Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ (1995) Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 115: 1265–1275.
16. Kendall C, Ionescu-Matiu I, Dreesman GR (1983) Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol Methods* 56: 329–339.
17. de Souza GE, Ferreira SH (1985) Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents Actions* 17: 97–103.
18. Kolli VK, Kanakasabapathy I, Faith M, Ramamoorthy H, Isaac B, et al. (2013) A preclinical study on the protective effect of melatonin against methotrexate-induced small intestinal damage: effect mediated by attenuation of nitrosative stress, protein tyrosine nitration, and PARP activation. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 1209–1218.
19. Freire MA, Oliveira RB, Picanco-Diniz CW, Pereira A, Jr. (2007) Differential effects of methylmercury intoxication in the rat's barrel field as evidenced by NADPH diaphorase histochemistry. *Neurotoxicology* 28: 175–181.
20. Wang D, Hu SS, Zhu J, Yuan J, Wu JJ, et al. (2013) Angiotensin II type 2 receptor correlates with therapeutic effects of losartan in rats with adjuvant-induced arthritis. *J Cell Mol Med* 17: 1577–1587.
21. Refaat R, Salama M, Meguid EA, El Sarha A, Gowayed M (2013) Evaluation of the effect of losartan and methotrexate combined therapy in adjuvant-induced arthritis in rats. *European Journal of Pharmacology* 698: 421–428.
22. Boukhettala N, Leblond J, Claeysens S, Faure M, Le Pessot F, et al. (2009) Methotrexate induces intestinal mucositis and alters gut protein metabolism independently of reduced food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E182–190.
23. Miyazono Y, Gao F, Horie T (2004) Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol* 39: 1119–1127.
24. Duncan M, Grant G (2003) Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther* 18: 853–874.
25. Sandmann S, Li J, Fritzenkotter C, Spormann J, Tiede K, et al. (2006) Differential effects of olmesartan and ramipril on inflammatory response after myocardial infarction in rats. *Blood Press* 15: 116–128.
26. Sonis ST, O'Donnell KE, Popat R, Bragdon C, Phelan S, et al. (2004) The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. *Oral Oncol* 40: 170–176.
27. Leitao RF, Ribeiro RA, Bellaguarda EA, Macedo FD, Silva LR, et al. (2007) Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother Pharmacol* 59: 603–612.
28. Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 92: 827–839.
29. Medina C, Radomski MW (2006) Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 933–938.
30. Naito Y, Takagi T, Kuroda M, Katada K, Ichikawa H, et al. (2004) An orally active matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, reduces dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Inflamm Res* 53: 462–468.
31. Al-Dasooqi N, Gibson RJ, Bowen JM, Logan RM, Stringer AM, et al. (2010) Matrix metalloproteinases are possible mediators for the development of alimentary tract mucositis in the dark agouti rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 235: 1244–1256.
32. Fujimoto M, Naka T (2010) SOCS1, a Negative Regulator of Cytokine Signals and TLR Responses, in Human Liver Diseases. *Gastroenterol Res Pract* 2010.
33. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, et al. (2002) SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 17: 677–687.
34. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A (2003) Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 4: 1169–1176.
35. He Y, Zhang W, Zhang R, Zhang H, Min W (2006) SOCS1 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of ASK1-JNK inflammatory signaling by mediating ASK1 degradation. *J Biol Chem* 281: 5559–5566.
36. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM (2000) Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 21: 495–502.
37. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Okamoto R, et al. (2009) RANK-RANKL Signaling Pathway Is Critically Involved in the Function of CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells in Chronic Colitis. *Journal of Immunology* 182: 6079–6087.
38. Maine GN, Mao X, Komarck CM, Burstein E (2007) COMMD1 promotes the ubiquitination of NFkappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *EMBO J* 26: 436–447.

39. Hovsepian E, Penas F, Siffo S, Mirkin GA, Goren NB (2013) IL-10 inhibits the NF-kappaB and ERK/ MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *PLoS One* 8: e79445.
40. Tewari KS, Java JJ, Gatliffe TA, Bookman MA, Monk BJ (2014) Chemotherapy-induced neutropenia as a biomarker of survival in advanced ovarian carcinoma: an exploratory study of the gynecologic oncology group. *Gynecol Oncol* 133: 439–445.
41. Yasufuku T, Shigemura K, Tanaka K, Arakawa S, Miyake H, et al. (2013) Risk factors for refractory febrile neutropenia in urological chemotherapy. *J Infect Chemother* 19: 211–216.