

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

LAYLA DUTRA MARINHO CABRAL

**INFLUÊNCIA DO RECEPTOR VANILÓIDE TIPO 1  
(TRPV1) NA ENDOTOXEMIA**

ALFENAS - MG

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

LAYLA DUTRA MARINHO CABRAL

**INFLUÊNCIA DO RECEPTOR VANILÓIDE TIPO 1  
(TRPV1) NA ENDOTOXEMIA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL- MG.

Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

ALFENAS - MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Cabral, Layla Dutra Marinho.  
Influência do receptor vanilóide tipo 1 (TRPV1) na endotoxemia /  
Layla Dutra Marinho Cabral. -- Alfenas, MG, 2016.  
149 f.

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.  
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal  
de Alfenas, 2016.  
Bibliografia.

1. Endotoxemia. 2. Lesão Pulmonar. 3. Comportamento Animal. I.  
Giusti-Paiva, Alexandre. II. Título.

CDD-571.9646

LAYLA DUTRA MARINHO CABRAL

**INFLUÊNCIA DO RECEPTOR VANILÓIDE TIPO 1 (TRPV1) NA  
ENDOTOXEMIA**

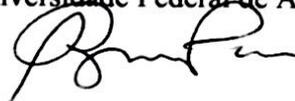
A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG.  
Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia

Aprovada em: 04 / 07 / 2016

Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

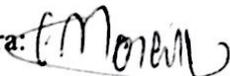
Assinatura:



Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura:



Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



*A Deus e a meus pais, por tudo que sou.*

## AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa termina, é tempo de agradecer!

A Deus, que sempre olhou por mim, dando força para superar cada obstáculo e conforto nos momentos necessários. Agradeço por me propiciar viver este tempo de tão grande crescimento profissional e pessoal. Maria, que sempre passou à minha frente, cuidando como mãe do que eu não era capaz, gratidão eterna.

Minha amada mãe, qualquer agradecimento é pouco! Obrigada sempre, e por tudo. Obrigada por acreditar em mim (muito mais do que eu mesma), por me acalmar, encorajar, confortar, aconselhar. Obrigada por ser meu exemplo, por me inspirar. Amo muito você (só enquanto eu respirar...)!

Pai, obrigada por me apoiar sempre e não medir esforços para tornar meus sonhos realidade, mesmo sem entendê-los muitas vezes, amo você. Ao meu irmão Guilherme, que com seu jeitinho peculiar comemorou comigo cada etapa, eu me orgulho muito de você, cabeçudo! Ao Gustavo, que não poupou orações, torcida e palavras de apoio, obrigada. E também às minhas cunhadas que sempre me incentivaram.

Ao Professor Alexandre, por me orientar e desafiar desde 2008. Agradeço pela paciência, compreensão e confiança. Enfim, sou muito grata por tantos ensinamentos.

A todos os colegas que passaram pelo laboratório durante todo este tempo, e tanto me ensinaram e tornaram a jornada mais leve, gratidão!

Àqueles que se tornaram grandes amigos, obrigada por cada momento de distração, comilanças, pelos ombros, abraços, conselhos, puxões de orelha, carinhos, palavras de força e confiança (tão grande que não sou merecedora). Vocês são anjos que Deus colocou em meu caminho, e sou imensamente grata. Sem vocês não teria a menor graça. Desejo que continuem a brilhar por onde passarem, e que sejam sempre muito felizes. Contem comigo.

Aos queridos amigos “do respiratório”, por tornarem as lembranças tão leves e felizes, pelos ensinamentos, afeto e auxílios. Professora Roseli, sou muito agradecida por todo apoio, confiança e carinho.

Ao professor Henrique Takachi Moryia, por todo ensinamento e gentileza. Obrigada por tornar a compreensão do Flexivent mais simples, e por ser sempre tão acessível.

Fer, professora Andrea Torrão e Magali, obrigada pela disponibilidade, por me receberem tão bem e tanto me ajudarem nas corridas, análises e discussões do blotting.

Agradeço aos professores do departamento, Giovani, Jalile, Renato e Silvia, bem como aos técnicos José Reis, Marina Venâncio e Luiz Felipe, pelos auxílios e convivência harmoniosa.

Aos membros da banca de qualificação, Professores Carolina Kosour, Giovane Galdino e Ana Flávia Almeida, pelas considerações e contribuições.

À secretária do PMPGCF Maria Antonieta, por cuidar das papeladas e burocracia com tanta eficiência.

Aos funcionários que sempre zelaram pela limpeza e organização do laboratório, sem deixar de lado o sorriso e simpatia, em especial a Marília, Martha, Helena, Giselda e Zélia.

Aos funcionários do biotério central da UNIFAL-MG.

Aos pequenos roedores, que sofrem e dão a vida para propiciar melhores condições a nós, humanos.

A todos os parentes (em especial tia Lone, tio Domingos, Vó Aracy e Vó Léa, Vô Lenito e Vô Lito - que lá do céu olha por mim) e amigos (de GV e da universidade) que compreenderam a ausência tantas vezes, e deram incentivo.

Professor Augusto, obrigada por plantar as sementinhas da pesquisa e responsabilidade nos primórdios da vida estudantil.

À UNIFAL-MG, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio estrutural e financeiro.

Aprendi que agradecer é uma forma de assegurar que algo essencial em nossas vidas nunca falte. Sendo assim, agradeço a cada um que cruzou e marcou meu caminho, e agradeço sempre, para que nunca faltem!

*“...Há uma força extremamente poderosa que a ciência ainda não encontrou explicação formal. É uma força que governa todas as outras e está atrás de qualquer fenômeno que opera no universo e que ainda não foi identificada por nós. Esta força universal é o amor. Quando cientistas estavam procurando uma teoria unificada do universo esqueceram a mais invisível e poderosa de todas as forças (...) O amor é potência, porque multiplica o melhor que temos, permitindo assim que a humanidade não se extinga em seu cego egoísmo (...) Esta força tudo explica e dá sentido à vida. Esta é a variável que temos ignorado por muito tempo...”*

*(ALBERT EINSTEIN, 19--)*

## RESUMO

A presença de endotoxina bacteriana na corrente circulatória é associada ao início e manutenção da sepse, condição complexa e heterogênea que promove a liberação de mediadores inflamatórios, os quais conduzem a alterações no sistema nervoso central e subsequente resposta imunológica inflamatória desequilibrada, com desencadeamento da síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO). Os receptores TRPV1, por sua vez, participam da modulação de diversos sistemas e podem influenciar processos fisiológicos comprometidos por inflamação, representando potencial alvo terapêutico. O objetivo do estudo foi avaliar a participação dos receptores TRPV1 na lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA) e no comportamento doentio induzidos por endotoxina por meio do bloqueio de tais receptores com capsazepina (CPZ) em camundongos. No tocante à LPA/SDRA, os camundongos tiveram lesão induzida por LPS 5,0mg/kg com simultânea aplicação de CPZ e foram submetidos à análise após 24 horas. Foi observada a redução das resistências do sistema e tecidual, além da diminuição do colapso alveolar com o bloqueio dos receptores TRPV1, evidenciando a modulação da LPA/SDRA por esses receptores. Em relação ao comportamento doentio, camundongos receberam administração de CPZ 30 minutos antes da aplicação de LPS 200µg/kg, e após 2 horas foram submetidos aos testes comportamentais, coleta de sangue e tecidos. Observou-se que a administração do bloqueador atenuou os efeitos tipo-ansiosos e depressivos, o aumento de temperatura corporal e a expressão de c-fos em algumas áreas encefálicas induzidos pelo LPS. Entretanto, a CPZ não promoveu alterações na mobilidade, ingestão alimentar, ganho de peso, níveis plasmáticos de citocinas e expressão proteica dos receptores no hipocampo e hipotálamo. Tais resultados sugerem a participação dos receptores TRPV1 na modulação do comportamento doentio, na regulação da temperatura corporal e na mecânica respiratória após desafio imunológico.

**Palavras-chave:** Endotoxemia. TRPV1. LPA. Comportamento doentio.

## **ABSTRACT**

Bacterial endotoxin presence in the bloodstream is associated with the onset and maintenance of sepsis, complex and heterogeneous condition that promotes the release of inflammatory mediators, which lead to changes in the central nervous system and subsequent unbalanced inflammatory immune response, with consequent multiple organ failure. The TRPV1 receptor, in turn, participate in the modulation of different systems and can influence physiological processes impaired by inflammation, and so represent a potential therapeutic target. The aim of the study was to evaluate the involvement of TRPV1 receptors in acute lung injury/ acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS) and in the sickness behavior induced by endotoxin, with the blockade by capsazepine (CPZ) in mice. Regarding the ALI/ARDS, animals had the disease induced by LPS 5.0mg/kg with simultaneous application of CPZ and were analyzed after 24 hours. Reduced resistance of the system and tissue was observed, in addition to decreased alveolar collapse by the blockade of TRPV1 receptors, showing a modulation by these receptors in the ALI/ARDS. Regarding sickness behavior, animals received CPZ administration 30 minutes before application of LPS 200 µg/kg, and after 2 hours were submitted to the behavioral tests and blood and tissues collection. The administration of blocker attenuated the anxious and depressive-like effects, the increased body temperature and the c-fos expression in some brain areas induced by LPS. However, CPZ did not promote changes in mobility, food intake, weight gain, plasma levels of cytokines and protein expression in the hippocampus and hypothalamus. These results suggest the involvement of TRPV1 receptors in the modulation of sickness behavior, in regulating body temperature and respiratory mechanics after immune challenge.

**Keywords:** Endotoxemy. TRPV1. ALI. Sickness behavior.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Efeito da administração (i.p.) de salina ou LPS (0,2; 1,0 ou 5,0 mg/kg) na mecânica respiratória (Rrs, Ers, Raw, Gtis e Htis).....	48
<b>Figura 02</b>	Efeito da administração (i.p.) de salina ou LPS (0,2; 1,0 ou 5,0 mg/kg) na mecânica respiratória (Crs e $\dot{V}$ ).....	49
<b>Figura 03</b>	Efeito do pré-tratamento (s.c.) com veículo ou CPZ na mecânica respiratória dos camundongos tratados (i.p.) com salina ou LPS (1.0mg/kg) .....	52
<b>Figura 04</b>	Efeito do pré-tratamento (s.c.) com veículo ou CPZ na mecânica respiratória dos camundongos tratados (i.p.) com salina ou LPS (5,0 mg/kg) (Rrs, Ers, Raw, Gtis e Htis).....	54
<b>Figura 05</b>	Efeito do pré-tratamento (s.c.) com veículo ou CPZ na mecânica respiratória dos camundongos tratados (i.p.) com salina ou LPS (5,0 mg/kg, i.p.) (Crs e $\dot{V}$ ).....	55
<b>Figura 06</b>	Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar.....	57
<b>Figura 07</b>	Efeito do pré-tratamento (s.c.) com veículo ou CPZ em camundongos tratados com salina ou LPS (5.0 mg/kg, i.p.) na pletismografia de corpo inteiro .....	59
<b>Figura 08</b>	Efeito do pré-tratamento (s.c.) com veículo ou CPZ na mecânica respiratória com desafio de metacolina de camundongos tratados com salina ou LPS (5.0 mg/kg, i.p.).....	61
<b>Figura 09</b>	Efeito após 2h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 $\mu$ g/kg, i.p.) no Campo Aberto.....	64
<b>Figura 10</b>	Efeito após 6h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 $\mu$ g/kg, i.p.) no Campo Aberto.....	65
<b>Figura 11</b>	Efeito após 24h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 $\mu$ g/kg, i.p.) no Campo Aberto.....	66
<b>Figura 12</b>	Efeito após 2 h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 $\mu$ g/kg) no Claro-Escuro.....	68
<b>Figura 13</b>	Efeito após 6h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 $\mu$ g/kg, i.p.) no Claro-Escuro.....	69

<b>Figura 14</b>	Efeito após 24h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 µg/kg) no Claro-Escuro.....	70
<b>Figura 15</b>	Efeito após 2h do tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 µg/kg, i.p.) no teste de Suspensão pela Cauda.....	74
<b>Figura 16</b>	Efeito após 6h do tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 µg/kg, i.p.) no teste de Suspensão pela Cauda.....	75
<b>Figura 17</b>	Efeito 24h após tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 µg/kg, i.p.) no teste de Suspensão pela Cauda.....	75
<b>Figura 18</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ em animais tratados com salina ou LPS no Campo Aberto.....	78
<b>Figura 19</b>	Efeito de pré-tratamento com veículo ou CPZ em análises temporais de camundongos tratados com salina ou LPS no teste de Campo Aberto....	79
<b>Figura 20</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ no Claro-Escuro feito em camundongos tratados com salina ou LPS.....	80
<b>Figura 21</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ na mobilidade de camundongos tratados com salina ou LPS.....	85
<b>Figura 22</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ e tratamento com salina ou LPS na temperatura corpórea de camundongos.....	87
<b>Figura 23</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ nos níveis de citocinas plasmáticas de animais tratados com salina ou LPS.....	89
<b>Figura 24</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de animais tratados com salina ou LPS (PVN e BNST).....	91
<b>Figura 25</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ na expressão de células positivas para c-fos em encéfalo de animais tratados com salina ou LPS (POA e SON).....	92
<b>Figura 26</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ na densidade óptica das bandas reveladas pelo método de <i>Western blotting</i> em camundongos tratados com salina ou LPS.....	93

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 01</b>	Porcentagem de alvéolos normais e colapsados no parênquima pulmonar .....	56
<b>Gráfico 02</b>	Efeito após 2h do tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 µg/kg, i.p.) no Nado Forçado.....	72
<b>Gráfico 03</b>	Efeito após 6h do tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 µg/kg, i.p.) no Nado Forçado.....	72
<b>Gráfico 04</b>	Efeito após 24h do tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 µg/kg, i.p.) no Nado Forçado.....	73
<b>Gráfico 05</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ nos animais tratados com salina ou LPS submetidos ao Nado Forçado.....	81
<b>Gráfico 06</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ no tempo de imobilidade do animal no teste de Suspensão pela Cauda realizado após tratamento com salina ou LPS .....	82
<b>Gráfico 07</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ no teste de ingestão alimentar realizado em camundongos tratados com salina ou LPS.....	83
<b>Gráfico 08</b>	Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ na variação do peso corporal dos camundongos tratados com salina ou LPS.....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Delimitações conceituais da <i>International Sepsis Definitions Conference</i> .....	23
<b>Tabela 02</b>	Análise estatística das diferentes doses de LPS na mecânica respiratória..	50
<b>Tabela 03</b>	Análises de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com CPZ ou veículo e submetidos ao tratamento com salina ou LPS 1,0 mg/kg na mecânica respiratória.....	53
<b>Tabela 04</b>	Análises de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com CPZ ou veículo e submetidos a tratamento com salina ou LPS 5,0 mg/kg na mecânica respiratória.....	55
<b>Tabela 05</b>	Análises dos grupos pré-tratados com CPZ ou veículo e submetidos a tratamento com salina ou LPS na porcentagem de alvéolos colapsados e normais.....	57
<b>Tabela 06</b>	Porcentagem de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) no tecido pulmonar.....	58
<b>Tabela 07</b>	Análise de duas vias na porcentagem de células polimorfonucleares (PMN) e de mononucleares (MN) no tecido pulmonar entre os grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS.....	58
<b>Tabela 08</b>	Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS nos dados da pletismografia de corpo inteiro .....	59
<b>Tabela 09</b>	Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS na mecânica respiratória com desafio de metacolina .....	62
<b>Tabela 10</b>	Porcentagem de mortalidade após 24horas do tratamento intraperitoneal com LPS ou salina e pré-tratamento com veículo ou CPZ.....	63
<b>Tabela 11</b>	Análise estatística de diferentes doses de LPS no teste de Campo Aberto.	67
<b>Tabela 12</b>	Análise estatística das diferentes doses de LPS no teste de Claro-Escuro..	71
<b>Tabela 13</b>	Análise estatística das diversas doses de LPS no teste Nado Forçado .....	73
<b>Tabela 14</b>	Análise estatística das diversas doses de LPS no teste de Suspensão pela Cauda .....	76

<b>Tabela 15</b>	Análise de variância de duas vias de grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos ao teste de Campo Aberto	79
<b>Tabela 16</b>	Análise de variância de duas vias de grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos ao teste de Claro-Escuro..	81
<b>Tabela 17</b>	Análise de variância de duas vias de grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos ao teste de Nado Forçado.	82
<b>Tabela 18</b>	Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos ao teste de Suspensão pela Cauda .....	83
<b>Tabela 19</b>	Análise de variância de duas vias de grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos ao teste de ingestão alimentar.....	84
<b>Tabela 20</b>	Análise de variância de duas vias de grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos à avaliação de mobilidade	86
<b>Tabela 21</b>	Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou capsazepina e tratados com salina ou LPS submetidos à avaliação da temperatura corporal .....	88
<b>Tabela 22</b>	Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS em relação à concentração de citocinas plasmáticas .....	89
<b>Tabela 23</b>	Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS em relação ao número de células positivas para c-fos.....	93
<b>Tabela 24</b>	Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS em relação à densidade ótica de bandas reveladas no teste de <i>Western blotting</i> .....	94

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>BNST</b>	- Núcleo da estria terminal
<b>C</b>	- Cruzamento(s)
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	- íons cálcio
<b>CB</b>	- Receptor canabinóide
<b>cmH<sub>2</sub>O</b>	- Centímetro de água
<b>COD</b>	- Coeficiente de determinação
<b>CPZ</b>	- Capsazepina
<b>Crs</b>	- Complacência do sistema respiratório
<b>Ef.</b>	- Efeito
<b>Ers</b>	- Elastância do sistema respiratório
<b>EPM</b>	- Erro padrão da mdia
<b>EUA</b>	- Estados Unidos da Amrica
<b>Fig.</b>	- Figura
<b>G</b>	- Gramas
<b>Gtis</b>	- Resistncia tecidual
<b>H</b>	- Hora/horas
<b>HHA</b>	- Hipotálamo-hipfise-adrenal
<b>Htis</b>	- Elastncia tecidual
<b>Hz</b>	- Hertz
<b>IL</b>	- Interleucina
<b>i.p.</b>	- Intraperitoneal
<b>Kg</b>	- Quilograma
<b>LPA</b>	- Leso aguda pulmonar
<b>LPB</b>	- <i>LPS- binding protein</i>
<b>LPS</b>	- Lipopolissacarídeo
<b>M</b>	- Molar
<b>Mch</b>	- Metacolina
<b>mg</b>	- Miligrama
<b>min</b>	- minuto (s)
<b>mL</b>	- Mililitro

<b>MN</b>	- Célula mononuclear
<b>PBS</b>	- Tampão fosfato
<b>PEEP</b>	- Pressão positiva expiratória final
<b>pH</b>	- Potencial hidrogeniônico
<b>PMN</b>	- Célula polimorfonuclear
<b>POA</b>	- Área pré-óptica
<b>PVN</b>	- Núcleo paraventricular do hipotálamo
<b>Raw</b>	- Resistência das vias aéreas
<b>Rrs</b>	- Resistência do sistema respiratório
<b>S</b>	- Salina
<b>S</b>	- Segundo(s)
<b>s.c.</b>	- Subcutâneo
<b>SCP</b>	- Substância Cinzenta Periaquedutal
<b>SDMO</b>	- Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
<b>SDRA</b>	- Síndrome do desconforto respiratório agudo
<b>SIRS</b>	- Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
<b>SNC</b>	- Sistema nervoso central
<b>SON</b>	- Núcleo supraóptico
<b>T.</b>	- Tempo
<b>TBE</b>	- 2,2,2 tribromoetanol
<b>TLC</b>	- Capacidade total pulmonar (do inglês, <i>Total lung capacity</i> )
<b>TLR4</b>	- <i>Toll like receptor 4</i>
<b>TNF</b>	- Fator de necrose tumoral
<b>TRP</b>	- Receptor de potencial transitório
<b>TRPV</b>	- Receptor vanilóide de potencial transitório
<b>V</b>	- Veículo
<b>Zrs</b>	- Impedância do sistema respiratório

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	- Graus celsius
=	- Igual
+	- Mais
±	- Mais ou menos
<	- Menor
/	- Por
%	- Porcentagem
~	- Aproximadamente
η	- Histeresividade
α	- Alfa
β	- Beta
μ	- Micro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
2.1	ENDOTOXEMIA E SEPSE .....	23
2.2	LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA)/ SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA).....	26
2.3	COMPORTAMENTO DOENTIO .....	28
2.4	RECEPTORES VANILÓIDES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO DO TIPO 1 (TRPV1).....	30
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
4.1	OBJETIVO GERAL .....	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
5.1	ANIMAIS .....	35
5.2	TRPV1 E O SISTEMA RESPIRATÓRIO .....	35
<b>5.2.1</b>	<b>Dose de LPS</b> .....	35
<b>5.2.2</b>	<b>Grupos experimentais</b> .....	36
<b>5.2.3</b>	<b>Avaliação da mecânica respiratória</b> .....	36
<b>5.2.4</b>	<b>Pletismografia de corpo inteiro</b> .....	37
<b>5.2.5</b>	<b>Análise histológica da lesão pulmonar induzida por LPS</b> .....	38
5.2.5.1	Retirada dos pulmões .....	38
5.2.5.2	Preparo histológico .....	38
5.2.5.3	Avaliação morfométrica .....	38
<b>5.2.6</b>	<b>Taxa de sobrevivência</b> .....	39
5.3	TRPV1 E O COMPORTAMENTO DOENTIO .....	39
<b>5.3.1</b>	<b>Dose de LPS</b> .....	39
<b>5.3.2</b>	<b>Grupos experimentais</b> .....	40
<b>5.3.3</b>	<b>Campo Aberto</b> .....	40
<b>5.3.4</b>	<b>Claro-Escuro</b> .....	41
<b>5.3.5</b>	<b>Nado Forçado</b> .....	41
<b>5.3.6</b>	<b>Suspensão pela Cauda</b> .....	41

<b>5.3.7</b>	<b>Ingestão alimentar e ganho de peso</b> .....	42
<b>5.3.8</b>	<b>Telemetria</b> .....	42
5.3.8.1	Medida da temperatura interna .....	43
5.3.8.2	Medida da mobilidade .....	43
<b>5.3.9</b>	<b>Imunohistoquímica</b> .....	43
<b>5.3.10</b>	<b>Dosagem de citocinas</b> .....	44
<b>5.3.11</b>	<b>Avaliação da expressão proteica por <i>Western Blotting</i></b> .....	45
5.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	46
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	47
6.1	TRPV1 NO SISTEMA RESPIRATÓRIO .....	47
<b>6.1.1</b>	<b>Efeito da administração de LPS na mecânica respiratória</b> .....	47
<b>6.1.2</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com CPZ na mecânica respiratória de camundongos com LPA/SDRA</b> .....	51
<b>6.1.3</b>	<b>Análise do parênquima pulmonar</b> .....	56
<b>6.1.4</b>	<b>Pletismografia de corpo inteiro</b> .....	58
<b>6.1.5</b>	<b>Análise da responsividade das vias aéreas</b> .....	60
<b>6.1.6</b>	<b>Análise da mortalidade</b> .....	62
6.2	TRPV1 E O COMPORTAMENTO DOENTIO .....	63
<b>6.2.1</b>	<b>Efeito da administração de LPS no comportamento doentio</b> .....	63
6.2.1.1	Campo aberto .....	63
6.2.1.2	Claro-escuro .....	67
6.2.1.3	Nado Forçado .....	71
6.2.1.4	Suspensão pela cauda .....	74
<b>6.2.2</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com CPZ no comportamento doentio</b> .....	76
6.2.2.1	Campo Aberto .....	77
6.2.2.2	Claro-Escuro .....	80
6.2.2.3	Nado Forçado .....	81
6.2.2.4	Suspensão pela Cauda .....	82
6.2.2.5	Ingestão alimentar e ganho de peso.....	83
6.2.2.6	Telemetria - análise da mobilidade e temperatura corpórea .....	85
6.2.2.7	Análise das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ .....	88
6.2.2.8	Análise da ativação neuronal .....	90
6.2.2.9	Análise da expressão dos receptores por <i>Western blotting</i> .....	93

<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	95
7.1	TRPV1 NO SISTEMA RESPIRATÓRIO .....	95
7.2	TRPV1 E O COMPORTAMENTO DOENTIO.....	100
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	114
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	115
	<b>ANEXO I</b> .....	141
	<b>ANEXO II</b> .....	143

## 1 INTRODUÇÃO

A endotoxina (lipopolissacarídeo; LPS) é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas associada ao início e manutenção da sepse, resposta inflamatória à infecção, caracterizada por subseqüentes alterações hemodinâmicas, respiratórias, metabólicas, hormonais, imunológicas e inflamatórias, que pode agravar-se e levar à disfunção orgânica e choque séptico, que possui taxas de mortalidade superiores a 80% (LEVY et al., 2003; MARTIN, 2013; NAMAS et al., 2012; PEREIRA JUNIOR et al., 1998; SPITZER, 1993).

Os componentes bacterianos promovem ampla ativação celular que resulta na liberação de diversos mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, óxido nítrico e radicais livres, que podem desencadear dano mitocondrial e celular. Tais mediadores são também responsáveis por vasodilatação e liberação de moléculas de adesão que resultam em migração de neutrófilos e monócitos e ativação de linfócitos e células endoteliais (KARIMA et al., 1999; VAN DER POLL, VAN DEVENTER, 1999).

A liberação dos mediadores inflamatórios, por diversas vias, é capaz de enviar sinais para o sistema nervoso central (SNC) que promovem alterações no sistema nervoso autônomo e endócrino, regulando a resposta do indivíduo à infecção (MARTIN, 2013) podendo causar anorexia, febre e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), tendo como resultado o aumento da produção dos corticoides (DANTZER, 2009).

Tais estímulos enviados ao SNC podem ser manifestados através de alterações comportamentais, caracterizando processo conhecido como comportamento doentio ou *sickness behavior*, que engloba várias alterações, como a redução de atividade locomotora, de ingestão de água e alimento e de interação social, que são vistas como estratégias de redirecionamento de energia para o combate da infecção (DANTZER, 2009; SILVA, GIUSTI-PAIVA, 2015).

Adicionalmente, é sabido que em resposta ao patógeno as citocinas produzidas e os próprios componentes bacterianos promovem a ativação da cascata de coagulação que resulta em hipoperfusão, coagulação intravascular disseminada e piora da função celular pela hipóxia. Sendo assim, em conjunto, estes fatores podem acarretar a disfunção orgânica, que dá início à condição letal de falência de múltiplos órgãos associada à resposta inflamatória severa à infecção (BONE, 1991; OSUCHOWSKI et al., 2006).

A disfunção de múltiplos órgãos, como dito, é muitas vezes causada pela produção excessiva de citocinas, que ocorre na síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sendo o pulmão um órgão comumente afetado, com desenvolvimento de lesão pulmonar aguda (LPA)/síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) por aproximadamente 40% dos pacientes sépticos, representando assim uma das principais causas de morte em pacientes internados na unidade de terapia intensiva (LI et al., 2015).

Diversos mediadores são liberados frente a ativação do sistema imune, como por exemplo as quimiocinas, óxido nítrico, citocinas, prostaglandinas, tromboxanos, histamina, endotelinas e bradicinina, que agem em vários tipos de receptores a fim de modular a resposta do organismo. Dentre os mediadores inflamatórios, é sabido que a bradicinina, fator de crescimento neural e as prostaglandinas podem induzir a estimulação dos receptores TRPV1 (receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1, do inglês *transient receptor potential – vanilloid*) (VOETS et al., 2005).

Eles são conhecidos também como receptores de capsaicina, e são canais catiônicos não seletivos expressos predominantemente nas fibras sensoriais de pequeno diâmetro ativadas por vários ligantes como capsaicina, resiniferatoxina, pH ácido, altas temperaturas, substâncias lipídicas endógenas chamadas de endovanilóides (como anandamida e derivados da lipooxigenase), além de alguns mediadores químicos endógenos liberados durante lesão tissular ou infecção, como dito anteriormente (CALIXTO et al., 2005; CATERINA et al., 1997; RYSKAMP, 2014; TOMINAGA et al., 1998; ZYGMUNT et al., 1999).

Esses receptores são expressos em várias regiões do SNC como por exemplo, o bulbo olfatório, córtex, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo (TOTH et al., 2005), sendo que a presença dos TRPV1 em estruturas encefálicas como o córtex pré-frontal, complexo amigdalóide, hipocampo, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (MEZEY et al, 2000; TOTH et al, 2005) sugere que esses receptores estejam envolvidos em diversas funções do SNC, além de participarem de controle dos estados emocionais relacionados ao medo e ansiedade (AGUIAR et al., 2014).

Estudos indicam a participação destes receptores também em patologias respiratórias, associando sua estimulação a mecanismos de tosse, hipersecreção, hiperreatividade, broncoconstrição e derrame vascular (GEPETTI, MATERAZZI, NICOLETTI, 2006; GRONEBERG et al., 2004; JIA & LEE, 2007).

Existem evidências crescentes de que vários receptores de potencial transitório (TRP), sobretudo os TRPV1, podem influenciar sistemas fisiológicos comprometidos na sepse e podem assim representar alvos terapêuticos potenciais (SAND et al., 2015). Portanto, o

importante papel dos receptores TRPV1 durante condições inflamatórias, faz deles protagonistas potenciais para ação de vários mediadores (CALIXTO et al., 2005) o que, juntamente à habilidade de integrar muitos estímulos torna os TRPV1 foco de diversos estudos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Nos tópicos apresentados a seguir encontra-se a revisão da literatura acerca dos temas abordados no trabalho.

### 2.1 ENDOTOXEMIA E SEPSE

Em 1991 em conferência de consenso entre o *American College of Chest Physicians* (ACCP) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) foram propostas delimitações conceituais e práticas em relação à resposta inflamatória sistêmica à infecção, sendo que dez anos após, em 2001, tais conceitos foram revistos, de acordo com o exposto na tabela 01 (LEVY et al., 2003).

Tabela 01- Delimitações conceituais da *International Sepsis Definitions Conference*

<b>Termo</b>	<b>Conceito</b>
<b>Infecção</b>	Processo patológico desencadeado por micro-organismo patogênico ou potencialmente patogênico.
<b>SIRS (Síndrome da resposta inflamatória sistêmica – do inglês <i>systemic inflammatory response syndrome</i>)</b>	Caracterizada por ser uma resposta inespecífica do organismo a uma variedade de situações que geram inflamação - infecção, queimaduras, pancreatite aguda, trauma, e outras. Sendo necessários, para sua detecção, combinação de condições descritas no documento.
<b>Sepse</b>	Síndrome clínica definida pela presença tanto de infecção quanto de resposta inflamatória sistêmica.
<b>Sepse severa</b>	Refere-se à sepse com disfunção de órgãos e é considerada uma das causas mais comuns de morte em UTIs.
<b>Choque séptico</b>	Estado de falência circulatória caracterizada pela hipotensão arterial não relacionada a outras causas.
<b>Disfunção de múltiplos órgãos</b>	Disfunção fisiológica progressiva em dois ou mais sistemas de órgãos após uma grave ameaça para a homeostase sistêmica.

Fonte: Dados retirados de Levy et al., 2003.

A endotoxemia corresponde à presença de endotoxina bacteriana na corrente circulatória, evento diretamente associado ao início e manutenção da sepse, que diz respeito à resposta inflamatória sistêmica secundária à infecção bacteriana grave (SPITZER, 1993). Existem múltiplas possibilidades de interação entre o organismo e patógeno, dentre elas a infecção, SIRS, sepse, sepse severa, choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

A ativação sistêmica inflamatória e das vias de coagulação, em resposta a uma infecção microbiana de partes normalmente estéreis do corpo caracterizam a sepse, condição devastadora em que a forma severa constitui causa de muita morte em unidades de terapia intensiva e está associada a taxas de mortalidade de 30-50% (LEVY et al., 2003; MAI et al., 2012).

Suas manifestações clínicas variam com a intensidade da resposta inflamatória sistêmica e a presença e gravidade de disfunções orgânicas (SILVA et al., 2004), tendo como os principais desencadeadores da resposta inflamatória do hospedeiro os componentes da parede bacteriana, no qual destacam-se os ácidos teicóico e lipoteicóico das bactérias gram-positivas e o lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina das bactérias gram-negativas (GLAUSER, 2000). As últimas são os microrganismos mais identificados em culturas de pacientes sépticos, embora também possam estar presentes as bactérias gram-positivas, fungos e vírus, sendo a interação destes elementos com o hospedeiro capazes de desencadear resposta imunológica inflamatória com desequilíbrio da homeostase e bloqueio metabólico em vários órgãos, o que promove a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) e óbito na maioria dos casos (PARILLO, 1993; PEREIRA JR et al., 1998).

O desenvolvimento de padrões experimentais de sepse para elucidar a progressão e fisiopatologia da patologia clínica abrange as últimas oito décadas e iniciou-se em 1930 com o isolamento da endotoxina (MAI et al., 2012). Um modelo frequentemente usado de sepse experimental envolve a administração sistêmica de endotoxinas (lipopolissacarídeo, LPS) (PATEL et al., 2010), que apresenta a vantagem da padronização de doses e de simular vários efeitos observados em pacientes com sepse e choque séptico, como as alterações hemodinâmicas, redução da perfusão tissular, diminuição do débito urinário, hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, coagulação intravascular disseminada e a produção de grandes quantidades de citocinas na circulação. Além disso, é um modelo prático e reproduzível em muitas espécies animais (BEM-SAHAUL et al., 1999; HINSHAW et al., 1992; MACARTHUR et al., 2000; MITAKA et al., 1997).

Sabe-se que durante a resposta inflamatória estimulada por endotoxina, as citocinas liberadas podem promover a reativação das células fagocitárias e dependendo da dose, desencadeiam vários efeitos no hospedeiro, como a ativação da cascata inflamatória, que forma um ciclo vicioso inflamatório (BLACKWELL; CHRISTMAN, 1996), perpetuando o ciclo inflamatório de abrangência sistêmica e induzindo estado hipercatabólico (ABBAS; LICHTMAN, 2004), o que reafirma a endotoxemia como o fenômeno predecessor da sepse (AKAMINE et al., 2007).

Patógenos que invadem o organismo são identificados de maneira inespecífica através de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) que são reconhecidos por células fagocíticas que expressam receptores TLRs (*Toll-like receptor*) e então desencadeiam resposta imune (DANTZER, 2009).

O LPS, em especial, no organismo do hospedeiro, liga-se à proteína específica no plasma, denominada LBP (*LPS-binding protein*), que acelera a associação do LPS ao receptor CD14, um receptor primário de LPS, que é expresso nos macrófagos. O complexo LPS-CD14 inicia a sinalização intracelular para interagir com o receptor de membrana, TLR-4 (*Toll-like receptor-4*), presente na superfície de células apresentadoras de antígenos (monócitos e macrófagos). Como resultado há o aumento da atividade fagocítica e indução da secreção de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, histamina e serotonina (KELMER, 2009); citocinas como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) e ainda a estimulação da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase 2 (COX 2) (NISHIO et al., 2013). Entretanto, embora as citocinas tenham papel fundamental na resposta inflamatória local, sua produção excessiva está relacionada com a resposta inflamatória sistêmica e suas repercussões (ROSENFELD; PAPO; SHAI, 2006).

As citocinas podem alcançar o sistema nervoso central por transportadores específicos presentes na barreira hematoencefálica ou migrar, através dos órgãos circunventriculares, para o encéfalo, onde alcançam direta ou indiretamente neurônios e células de apoio (microglia e astrócitos) que promoverão alterações no sistema nervoso autônomo e endócrino, regulando a resposta do indivíduo à infecção (MARTIN, 2013). As interações entre o sistema nervoso central e sistema imunológico são consideradas componentes principais da resposta inflamatória à sepse, e causam alterações nos sistemas neuroendócrino, autonômico (CHROUSOS, 1995), comportamental (GORDON et al., 2004) e distúrbios em quaisquer funções adaptáveis como as respostas imuno-inflamatórias e hemodinâmicas no sistema nervoso central (SAPER; BREDER, 1994; SHARSHAR et al., 2004).

Portanto, o marcado desequilíbrio nas respostas de citocinas, acaba por transformar em resposta danosa o que normalmente seria benéfico para combater a infecção (RITTIRSCH, FLIERL, WARD, 2008). O resultado é a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, com instalação de um estado de difícil controle e evolução imprevisível que pode culminar com a disfunção múltipla dos órgãos e óbito do paciente (JANDA et al., 2010), sendo a endotoxemia seguida de liberação de TNF $\alpha$  e indução de sepse, a principal causa de SDMO (AKAMINE et al., 2007).

É sabido que os rins, pulmões e o fígado são especialmente vulneráveis a danos durante a sepse e que existe forte associação entre a quantidade de sistemas e órgãos com disfunção e a situação dos pacientes, sendo que quanto mais órgãos com disfunção, maior o risco de morte do indivíduo (ROSSAINT; ZARBOCK, 2015).

## 2.2 LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA)/SÍNDROME DA DISFUNÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA (SDRA)

Diversas condições clínicas atuam como fatores possíveis de desencadear e/ou predispor a síndrome da disfunção respiratória aguda (SDRA), podendo o sistema sofrer efeito direto dos fatores etiológicos no parênquima pulmonar, caracterizando a SDRA pulmonar (causada por lesão direta), ou então mediadores inflamatórios liberados em qualquer outro órgão ou sistema do corpo podem promover alterações pulmonares por lesão indireta (SDRA extrapulmonar) (KOSOUR et al., 2014).

A primeira designação da síndrome da disfunção respiratória aguda foi realizada em 1927, sendo que recentemente, em 2011, no Congresso da Sociedade Europeia de Berlim foi discutida e apresentada uma nova definição em que a SDRA é descrita como um tipo de lesão pulmonar inflamatória de instalação aguda que promove aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos pulmonares, aumento do peso pulmonar e perda de tecido pulmonar aerado, caracterizada clinicamente por hipoxemia, opacidade bilateral em radiografia, associada ao aumento do espaço morto, diminuição da complacência pulmonar e dano alveolar difuso (edema, inflamação ou hemorragia) (KOSOUR et al., 2014; RANIERI et al., 2012).

A lesão pulmonar aguda (LPA - do inglês *acute lung injury* - ALI), por sua vez, é caracterizada como uma forma branda da SDRA, sendo definida da mesma maneira, distinguindo-se apenas pelo grau menos acentuado de hipoxemia. Portanto, vem sendo

proposto o uso do termo SDRA de forma indistinta, apenas com a classificação da SDRA como leve, moderada ou grave (AMATO et al., 2007; RANIERI et al., 2012).

A LPA aguda, que origina a SDRA, é geralmente caracterizada pela injúria do endotélio e epitélio pulmonar, e conseqüentemente lesão da membrana alveolocapilar, sendo que a promoção e perpetuação da síndrome é atribuída a diversos mediadores como espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação anormal de proteases, neutrófilos, macrófagos e linfócitos e citocinas pró-inflamatórias, que promovem adesão, quimiotaxia, ativação de leucócitos e a perda sustentada da função da barreira alveolocapilar normal, além de poderem desencadear a hipoxemia, devido a lesão celular e alterações no surfactante promovida com distúrbio da relação ventilação/perfusão. (CHOPRA; REUBEN; SHARMA, 2009; KOSOUR et al., 2014). Sendo assim, a intensa inflamação dos pulmões com dano alveolar pode resultar em disfunção de múltiplos órgãos e morte (LIN et al, 2015), tendo como a principal causa de desenvolvimento LPA na clínica, a sepse (MATTHAY; ZEMANS, 2011).

Os agentes infecciosos podem afetar os pulmões indiretamente (via compartimento vascular), fazendo com que a doença se desenvolva rapidamente (STEINBERG; HUDSON, 2000), sendo as endotoxinas capazes de promover ativação do sistema enzimático do plasma, complemento e liberação do fator de Von Willebrand (marcador de ativação endotelial presente em processos inflamatórios cujos índices elevados são relacionados a risco aumentado de trombose). Na presença de sepse, por sua vez, ocorre a liberação de citocinas e sobretudo o TNF promove efeito citotóxico direto no endotélio com a interação com as células endoteliais e aumento da atividade pró-coagulante e a produção do inibidor do plasminogênio, facilitando a coagulação e promovendo a ativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos, que por sua vez liberam radicais livres (KARAKAYA et al., 2016; KOSOUR et al., 2014).

Os pulmões são particularmente vulneráveis a lesões inflamatórias devido a liberação de mediadores que é feita na circulação e portanto os atingem diretamente através do débito cardíaco. Na LPA ocorre lesão do epitélio alveolar e do endotélio capilar por diferentes mediadores pró-inflamatórios, particularmente pelas citocinas, tais como o TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8 e como consequência, os neutrófilos são atraídos e tornam-se ativados, liberando mediadores inflamatórios, como oxidantes e proteases, que lesam diretamente o epitélio alveolar e o endotélio vascular, propagando o processo inflamatório. (MEDURI et al., 1995; MATTHAY; ZEMANS, 2011). As pontes de ligações das proteínas de junção aderente no endotélio (caderina endotelial - manutenção da integridade dos microvasos) são desestabilizadas por citocinas como TNF- $\alpha$ , leucócitos e o sistema de coagulação, sendo

assim promovem lesão de células epiteliais, causando disfunção do transporte de fluido normal no epitélio, induzindo a formação do edema pulmonar (PUGIN et al., 1999). Desse modo, as barreiras habitualmente responsáveis por impedir edema alveolar são perdidas, havendo escape de proteínas do espaço intravascular em direção ao espaço intersticial (WARE; MATTHAY, 2000; WIEDEMANN, 2006). O influxo de líquido rico em proteínas para o interior dos alvéolos altera a integridade do surfactante, com lesão adicional ao tecido pulmonar e gera colapso alveolar (WARE; MATTHAY, 2000; WIEDEMANN, 2006).

Portanto, a sepse provocada através de infecções por bactérias gram-negativas promove uma resposta exagerada do hospedeiro à infecção e é a causa mais relevante e letal de LPA/SDRA, síndrome de etiologia multifatorial caracterizada por lesão morfológica específica chamada de dano alveolar difuso, evidenciado pela substituição do edema por necrose celular, hiperplasia epitelial, inflamação e fibrose decorrentes da evolução do processo, sendo considerados fortes indicativos de predisposição à mortalidade na SDRA/LPA os níveis persistentemente elevados de IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  (KATZENSTEIN; BLOOR; LEIBOW, 1976; KOSOUR et al., 2014; MEDURI et al., 1995; REISS; UHLIG; UHLIG, 2012.).

### 2.3 COMPORTAMENTO DOENTIO

As citocinas, sobretudo IL-1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ), IL-6 e TNF-  $\alpha$ , são tidas ainda como fatores desencadeantes de alterações psicológicas e comportamentais, que associadas à resposta febril e alterações neuroendócrinas, representam uma estratégia altamente organizada para combater a infecção, denominada comportamento doentio (do inglês *sickness behavior*) (DANTZER, 2009).

O comportamento doentio é uma resposta fisiológica bem estabelecida promovida pela ativação do sistema imune com resposta adaptativa e alterações neuroimunes específicas a fim de combater o patógeno invasor e promover a cura rapidamente, protegendo o organismo. Geralmente é um estado temporário, todavia, quando persistente, reações adversas e danosas são observadas, como, por exemplo o déficit de memória e disfunção cognitiva (DANTZER, 2009; KIRSTEN et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

É sabido que o contexto ambiental em que o animal se encontra também é capaz de modular tal comportamento, sendo que em situações em que há risco de morte ou

envolvimento em confronto (predadores, concorrentes e extremos climáticos, por exemplo), são priorizadas condutas como a luta ou fuga e comportamento materno, em relação ao comportamento doentio (KIRSTEN et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

Estímulos como obesidade (ASTIZ et al., 2016), deleção de hormônios ovarianos (AZIZI-MALEKABADI et al., 2016), câncer e doenças auto-imunes (DANTZER et al., 2009) são capazes de promover a ativação do sistema imune e portanto são relacionados ao comportamento doentio, entretanto a forma mais usual e estudada para indução na experimentação animal é a administração de lipopolissacarídeo (BENSON et al., 2012; HEUMANN; ROGER, 2002; KONSMAN et al., 2008), potente indutor que através da ativação de uma cascata de processos imunes e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), contribui para alterações de comportamentos, respostas fisiológicas, neuroendócrinas e metabólicas que caracterizam o comportamento doentio (BANASIKOWSKI et al., 2015; KIRSTEN et al., 2015).

A ativação do sistema imune inato via LPS ocorre por meio dos receptores *toll-like* (TLR)-4 nas células imunológicas, incluindo macrófagos e monócitos que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ), TNF- $\alpha$  e IL-6 que em conjunto promovem as alterações comportamentais características (BARTON, MEDZHITOV 2003; DANTZER, 2009). Tais modificações comportamentais são produzidas por meio da ação de citocinas no encéfalo, que ocorre através de duas formas principais: via neural, por meio de neurônios aferentes primários que inervam a região do corpo onde ocorre o processo infeccioso; e via humoral, em que citocinas pró-inflamatórias são produzidas por fagócitos nos órgãos circunventriculares e plexo coroide em resposta aos PAMPs ou citocinas, seguidos pela propagação de sinais imunes no parênquima encefálico (DANTZER, 2009).

Durante o evento são observadas características típicas como redução da atividade e exploração ambiental, da ingestão de água e alimentos, da interação social, da memória, do comportamento sexual, além da ocorrência de febre. Tais alterações são tidas como possibilidade de economia energética com finalidade de redirecionamento para o combate à infecção (HART, 1988; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015).

A redução da atividade locomotora é uma resposta comumente vista após tratamento agudo com endotoxina, além do aumento do comportamento tipo-ansioso, que são respostas à infecção observadas após tratamento de roedores com doses variáveis de LPS (50-250  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), parâmetros avaliados por uma série de medidas, como número de transições claro-escuro, tempo no centro do campo aberto e reduções no comportamento social (BANASIKOWSKI et al., 2015).

Outro comportamento comumente observado após administração de LPS é o tipo-depressivo, explicado, em sua maior parte, pela desregulação do eixo HHA, sendo parâmetros como aumento no tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda e anedonia, considerados como preditivos de comportamento tipo-depressivos em animais (DANTZER, 2009; LI et al., 2015).

A febre, fator associado ao comportamento doentio, é uma resposta importante que ocorre como parte da reação de fase aguda durante processos infecciosos e inflamatórios, como parte de estratégia de defesa organizada pelo sistema imune quando o corpo é invadido por agentes estranhos, de natureza infecciosa ou não, sendo o LPS um pirógeno exógeno frequentemente utilizado para a simulação laboratorial (ROMANOVSKY et al., 1996; ZEISBERGER, 1999).

Dentre os mais diversos receptores envolvidos na modulação de comportamentos, é sabido que os receptores vanilóides de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1) estão sendo estudados e relacionados às alterações típicas do comportamento doentio. Estudos apontam os receptores em questão como alvo potencial para o desenvolvimento de drogas ansiolíticas (KASCKOW et al., 2004; MICALE et al., 2009; RUBINO et al., 2008; TERZIAN et al., 2009), além de atuarem no comportamento tipo-depressivo (HAYASE, 2011; KASCKOW et al., 2004; MANNA; UMATHE, 2012; YOU et al., 2012) e controle da temperatura corporal (ALAWI et al., 2015; IIDA et al., 2005; MILLS et al., 2008; ROMANOVSKY et al., 2009).

#### 2.4 RECEPTORES VANILÓIDES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO DO TIPO 1 (TRPV1)

Receptores de potencial transitório (TRP- do inglês *Transient Receptor Potential*) são uma família de canais catiônicos permeáveis a íon cálcio em sua maioria, formados por seis domínios transmembrana que podem ser ativados por diversos estímulos (mecânicos, químicos e térmicos) e estão divididos em subfamílias de acordo com a sequência de aminoácidos (BEVAN; ANDERSSON, 2009; NILIUS et al., 2007; WU et al., 2010).

O TRPV1 (receptor vanilóide de potencial transitório do tipo 1, do inglês *Transient Receptor Potential Vanilloid type 1*), faz parte da família TRP e foi primeiramente clonado por Caterina e colaboradores em 1997. É formado por seis domínios transmembrana, terminais intracelulares N- e C-, e um poro. Os TRPV1 são canais catiônicos não seletivos com preferência aos íons cálcio ativados por calor, baixos níveis de pH e substâncias

exógenas tais como a capsaicina (composto isolado da pimenta vermelha-*Capsicum SP*) e por outras toxinas provenientes de plantas, sendo a resiniferatoxina a mais potente (CALIXTO et al, 2005; SZALLASI; BLUMBERG, 1999; TOMINAGA; CATERINA, 2004; VAN DER STELT; DI MARZO, 2005). Os ligantes endógenos são conhecidos como endovanilóides e entre eles, pode-se citar a anandamida (N arachidonoil-etanolamina), derivados de ácidos graxos, como o NADA (N-arachidonoil-dopamina) e produtos da lipooxigenase, como o 12-S-HPETE (12-(S)-ácido hidroperóxicosatetraenóico) que geralmente apresentam também alguma afinidade para receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) (STAROWICZ et al., 2007).

Dentre os compostos tidos como antagonistas têm-se iodoresiniferatoxina (I-RTX), SB-705498, AMG 517 (SZALLASI et al., 2007), o selênio (BALABAN et al., 2016), SZV-1287 (PAYRITS et al., 2016) e a capsazepina (CPZ), sendo o último usado como antagonista competitivo padrão do receptor TRPV1 em estudos farmacológicos com abordagens *in vitro* e *in vivo*, entretanto além da ação antagônica à capsaicina o composto também exerce atividade em receptores de acetilcolina e canais de cálcio voltagem dependentes (BEVAN et al., 1992, DOCHERTY; YEATS PIPER 1997; GONZALEZ-REYES et al. 2013; LIU; SIMON 1997; MAGGI et al., 1993; WALPOLE, 1994).

A ativação destes canais pode promover excitação neuronal que é seguida por um estado refratário durante o qual os neurônios previamente excitados deixam de responder ao estímulo. Este fenômeno é conhecido como dessensibilização, cujo potencial terapêutico tem sido explorado no contexto da dor (CATERINA et al., 1997; SZALLASI et al., 2007).

Eles são expressos em diversas regiões encefálicas, como bulbo olfatório, córtex, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo (TOTH et al, 2005), o que sugere o envolvimento dos receptores TRPV1 em diversas funções do SNC, sendo que a presença deles em estruturas como o córtex pré-frontal, complexo amigdalóide, hipocampo, hipotálamo e SCP (MEZEY et al., 2000; TOTH et al., 2005) em conjunto com a participação desses receptores na modulação da liberação de glutamato sugerem que eles participem do controle de estados emocionais e respostas relacionadas a ansiedade e depressão (BERGINK et al., 2004; MARINELLI et al., 2002; PALAZZO et al., 2002; STAROWICZ et al., 2007; XING; LI, 2007).

Já foram estudados diversos tipos de comportamento relacionando ao receptor vanilóide tipo 1, com modelos de administrações periféricas e centrais de agonistas e antagonistas bem como uso de animais modificados geneticamente.

Animais *knockout* para o receptor TRPV1 mostraram comportamento anti-depressivo, ansiolítico, além de aumento de comportamento agressivo e diminuição de interação social e da memória de curta e longa duração (YOU et al., 2012, MARSCH et al., 2007). A

locomoção, quando avaliada nesses animais não foi influenciada quando comparados aos selvagens (MARSCH et al., 2007). Agonistas e antagonistas do TRPV1, por sua vez, mostraram exercer efeito em comportamento tipo-ansioso (KASCKOW; MULCHAHEYB; GERACIOTI JR, 2003; MANNA; UMATHE, 2011; TERZIAN et al., 2009), também no comportamento obsessivo-compulsivo (UMATHE; MANNA; JAIN 2012) e de pânico (CASAROTTO et al., 2012).

A maneira exata como o receptor TRPV1 é capaz de modular diversos tipos de comportamento ainda é desconhecida, entretanto, alterações nas transmissões sinápticas mediadas por glutamato parecem ser o mecanismo mais aceito pelo qual os receptores TRPV1 poderiam influenciar diversas condições fisiológicas, incluindo plasticidade neural e facilitação de comportamento aversivos (AGUIAR et al., 2014; BENNION et al., 2011; FEINMARK et al., 2003; GIBSON et al., 2008; KAUER; GIBSON, 2009; CHAVEZ; CHIU; CASTILLO, 2010; GRUETER; BRASNJO; MALENKA, 2010; LI et al., 2008; MARSCH et al., 2007; TERZIAN et al., 2009).

Já nas vias respiratórias, os receptores TRP, incluindo TRPV1, TRPA1, TRPV4, e TRPM8, são expressos e envolvidos na regulação das vias aéreas (AOKI; MOGI; OKAJIMA, 2014) e foram identificados em axônios das camadas epiteliais e sub-epiteliais traqueais, além de músculo liso das vias aéreas e vasos sanguíneos das vias aéreas inferiores (FISHER, 2009). Sabe-se também que a ação dos agonistas nas vias aéreas causa tosse, broncoconstrição, derrames microvasculares, hiper-reatividade e hipersecreção (GEPPETTI; MATERAZZI; NICOLETTI, 2006).

Dentre os diversos locais de expressão, a atividade do TRPV1 pode ser potencializada por mediadores oriundos de lesão tecidual, sendo assim, sugere-se a participação deste receptor na sepse com papel anti-inflamatório (DEVESA et al., 2011). Nas vias respiratórias, por exemplo, estudo com pacientes com doenças com características inflamatórias sugerem a possibilidade de efeitos benéficos com uso de antagonistas de TRPV1 (GEPPETTI; MATERAZZI; NICOLETTI, 2006).

Como se vê, os canais TRP e suas disfunções têm sido amplamente estudados e apontados como possíveis moduladores de diversas doenças, como a dor crônica e bexiga hiperativa (TRPV1), obesidade (TRPV4 e TRPM5), diabetes (TRPV1, TRPM4), tosse crônica (TRPA1, TRPV1), doença pulmonar obstrutiva crônica (TRPV4), hipertrofia cardíaca (TRPC6), doença de Alzheimer (TRPM7), distúrbios dermatológicos (TRPV3), além de câncer (TRPC6, TRPV2 e TRPM8) (KANEKO; SZALLASI, 2014). Além dos TRPV1 de serem sugeridos como participantes em processos inflamatórios (DEVESA et al., 2011).

### 3 JUSTIFICATIVA

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica que pode levar a alterações comportamentais, além da disfunção de múltiplos órgãos com alta taxa de mortalidade. Apesar de existirem muitos estudos a respeito da sua prevenção e cura, além de decorrentes aprimoramentos, a sepse continua a ser uma das principais causas de morte em unidades de terapia intensiva – UTI, principalmente quando existe disfunção orgânica associada, sendo os pulmões órgãos especialmente vulneráveis (ROSSAINT; ZARBOCK, 2015; YAO et al., 2015).

Tendo em vista que a ansiedade e depressão, alterações comportamentais típicas do comportamento doentio, são as maiores causas de perda de produtividade e incapacidade (WHITEFORD et al., 2013), faz-se necessário também o entendimento pleno da comunicação entre sistema imune e encéfalo por meio dos efeitos centrais de citocinas pró-inflamatórias durante endotoxemia/sepse a fim de elucidar aspectos comportamentais de adaptações encefálicas e comportamentais durante inflamação aguda, além da influência em uma gama de condições neuropsiquiátricas (LASSELIN et al., 2016).

Sendo assim, embora existam diversos estudos sugerindo a participação dos receptores TRPV1 em processos inflamatórios, vários aspectos continuam sem esclarecimento, principalmente no que diz respeito aos tipos de ação específica desses receptores, assim como sua influência na expressão e liberação de moléculas proinflamatórias pelas diversas células envolvidas (DEVESA et al., 2011). Desse modo, estabelecer a maneira pela qual os receptores TRPV1 modulam as alterações durante endotoxemia se torna um objetivo necessário para o progresso dos estudos farmacológicos sobre estes receptores com evidente potencial terapêutico.

## 4 OBJETIVOS

A seguir estão descritos o objetivo geral e os específicos do presente estudo.

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a participação dos receptores TRPV1 no comportamento doentio e sistema respiratório durante endotoxemia.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as alterações na mecânica respiratória produzidas pela endotoxemia bem como a participação dos receptores TRPV1 neste processo.
- b) Estudar os efeitos do bloqueio dos receptores TRPV1 sobre o parênquima pulmonar.
- c) Analisar as alterações comportamentais induzidas pela endotoxemia e verificar os efeitos do bloqueio dos receptores TRPV1 em camundongos com endotoxemia.
- d) Examinar o efeito do bloqueio do receptor TRPV1 na febre causada por LPS.
- e) Averiguar a participação dos receptores TRPV1 na ativação neuronal de regiões encefálicas de animais endotoxêmicos.
- f) Investigar o efeito do bloqueio dos receptores TRPV1 nos níveis plasmáticos de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) em camundongos com endotoxemia.
- g) Avaliar a expressão dos receptores TRPV1 em estruturas encefálicas envolvidas na modulação de comportamentos durante endotoxemia.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados neste trabalho estão descritos a seguir.

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos ( $35 \pm 10$ g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL que foram mantidos em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e iluminação (12h claro/escuro), com livre acesso à água e ração comercial sendo que ao término, os animais foram sacrificados com excesso de anestésico inalatório. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Alfenas, sob números de protocolo 518/2013 e 567/2014.

### 5.2 TRPV1 E O SISTEMA RESPIRATÓRIO

Para estudo da participação dos receptores TRPV1 no sistema respiratório foram utilizados os materiais e métodos descritos abaixo.

#### 5.2.1 Dose de LPS

A fim de estabelecer a dose e tempo mais adequados para o estudo das alterações na mecânica respiratória produzidas pela LPA/SDRA, foram utilizadas doses de 0,2, 1,0 e 5,0 mg/Kg de Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (026: B6 – Sigma Aldrich, Brasil) ou salina (veículo; NaCl 0,9%), administrados intraperitonealmente com realização do teste de mecânica respiratória transcorridas 2,6 ou 24 horas da aplicação.

### 5.2.2 Grupos experimentais

Após o estabelecimento da dose de LPS e o tempo a serem utilizados, os animais foram divididos randomicamente nos seguintes grupos de trabalho:

- a) Veículo + Salina;
- b) Veículo + LPS;
- c) Capsazepina + Salina e
- d) Capsazepina + LPS.

Os animais receberam veículo (10% tween, 10% etanol, 80% salina) ou capsazepina (15 mg/kg; N-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-2H-2-benzazepine-2-carbothioamide, Sigma Aldrich, Brasil) subcutaneamente (BHATIA, 2006) imediatamente antes da administração de salina ou LPS (1,0 e 5,0 mg/Kg para análise da mecânica respiratória e 5,0 mg/kg para as demais avaliações) via intraperitoneal e após 24 horas foram submetidos aos testes. Todas as soluções foram administradas na proporção de 10mL/kg.

### 5.2.3 Avaliação da mecânica respiratória

Os experimentos foram conduzidos com a parede do tórax preservada e ao término do experimento a traquéia foi clampeada no final da expiração para remoção dos pulmões após a morte do animal por exsanguinação.

Para tal análise os camundongos foram sedados com cloridrato de ketamina (34 mg/kg; Agener União, Brasil) e cloridrato de xilazina (12 mg/kg; Vetbrands, Brasil) intraperitonealmente. Após instalação da anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em uma placa aquecedora (Heat Pad, Insight, Brasil) mantida a 37°C, sob foco cirúrgico, posteriormente traqueostomizados e conectados ao respirador para pequenos animais (Flexivent, Scireq, Montreal, Canadá).

Os camundongos foram ventilados com um volume corrente de 10 mL/Kg, frequência respiratória de 180 ciclos/minuto e PEEP de 3 cmH<sub>2</sub>O, conectado à válvula expiratória do ventilador para evitar o colapso alveolar. Posteriormente foi induzida paralisia muscular através de uma injeção intraperitoneal de brometo de pancurônio (0,5 mL/Kg; Cristália,

Brasil) e após completa paralisia realizadas duas manobras de recrutamento pulmonar (*total lung capacity- TLC*) com intervalo de 30s entre elas, seguida de manobras de Snapshot e Prime-8. O Snapshot é uma perturbação com oscilação forçada de 1,2 segundos de duração e frequência de 2,5 Hz que dão acesso aos parâmetros de Resistência do sistema respiratório ( $R_{rs}$ ), Elastância do sistema respiratório ( $E_{rs}$ ) e Complacência do sistema respiratório ( $C_{rs}$ ); já o Prime-8 é oscilação forçada de duração de 8 segundos e componentes de frequência entre 0 e 20 Hz que acessa a Resistência das vias aéreas ( $R_{aw}$ ), Resistência do tecido pulmonar ( $G_{tis}$ ), Elastância do tecido pulmonar ( $H_{tis}$ ) e Histeresividade ( $\eta$ ) (SHALABY et al., 2010).

Para análise da hiperresponsividade das vias aéreas os animais recebiam nebulização (Aeroneb, Aerogen, Irlanda) com salina para determinação dos valores basais dos parâmetros respiratórios, seguida do broncoconstritor metacolina (MCh; acetyl- $\beta$ -methylcholine chloride, Sigma<sup>®</sup>- Aldrich, St. Lois, EUA) na concentração de 50 e 100 mg/mL respectivamente para avaliar a hiperresponsividade brônquica. Após o registro e coleta dos dados, foi utilizado o maior valor do coeficiente de determinação (COD), parâmetro que fornece confiabilidade dos resultados, para análise das informações (SANTOS et al., 2014).

#### **5.2.4 Pletismografia de corpo inteiro**

Os parâmetros ventilatórios foram medidos pelo método de pletismografia de corpo inteiro para pequenos animais descrito por Bartlett e Tenney (1970). O camundongo era colocado individualmente em uma câmara rígida vedada à entrada de gases e as oscilações de pressão no interior da câmara foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros ventilatórios. Durante cada medida de ventilação a câmara permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 minutos) e os sinais gerados pelas oscilações de pressão causadas pela respiração do animal foram captados por um transdutor acoplado à câmara e traduzidos em parâmetros de frequência respiratória, volume de ar corrente e volume pulmonar.

## 5.2.5 Análise histológica da lesão pulmonar induzida por LPS

A metodologia e os materiais utilizados para a coleta e análise histológica dos pulmões estão descritos abaixo.

### 5.2.5.1 Retirada dos pulmões

Após o teste de mecânica respiratória, antes de interromper a ventilação, os camundongos tiveram o abdome aberto cirurgicamente para administração de heparina sódica (1000 UI; Cristália, Brasil) na veia cava para posterior exsanguinação do animal. Ao fim da expiração mecânica, a traquéia foi ocluída com um fio de algodão e os pulmões foram removidos e armazenados em paraformaldeído 10% (0,1M, pH 7,4; Dinâmica, Brasil) por 7 dias, até a data de processamento.

### 5.2.5.2 Preparo histológico

Os pulmões foram submetidos a processamento (desidratados, diafanizados e incluídos em parafina) para realização de cortes histológicos de 4 µm de espessura e posteriormente as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H.E.).

### 5.2.5.3 Avaliação morfométrica

Por meio de microscopia óptica (Eclipse 80i Nikon Corporation, Japão) foi feita leitura cega (o pesquisador não sabia a que grupo experimental as lâminas pertenciam) das lâminas utilizando a técnica convencional de contagem de pontos (“*point-counting*”) estabelecida por Weibel, 1990.

Em aumento de 200x, utilizando-se um retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular do microscópio foram analisados 10 campos aleatórios e não coincidentes por lâmina e quantificada a fração de alvéolos normais e colapsados.

O mesmo procedimento foi utilizado para quantificação das células inflamatórias que foram avaliadas em aumento de 1000x e os pontos que insidiam nas células foram contados para realização de cálculos e obtenção da porcentagem de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN).

### **5.2.6 Taxa de sobrevivência**

Após os tratamentos com veículo ou capsazepina e salina ou LPS, foi avaliada a porcentagem de animais que evoluíram à morte.

## **5.3 TRPV1 E O COMPORTAMENTO DOENTIO**

Os materiais e métodos utilizados para a avaliação da participação dos receptores TRPV1 no comportamento doentio estão descritos abaixo.

### **5.3.1 Dose de LPS**

A fim de estabelecer a dose e tempo mais adequados para o estudo das alterações comportamentais produzidas pelo LPS, foram utilizadas doses de 100, 200, 500 e 1000 µg/Kg de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (026: B6 – Sigma Aldrich, EUA) realizando o teste transcorridas 2,6 e 24 horas da administração única de LPS ou veículo (salina, NaCl 0,9%) via intraperitoneal.

### 5.3.2 Grupos experimentais

Após o estabelecimento da dose de LPS e o tempo após administração ideais para as análises comportamentais, os animais foram divididos randomicamente nos seguintes grupos de trabalho:

- a) Veículo + Salina;
- b) Veículo + LPS;
- c) Capsazepina + Salina;
- d) Capsazepina + LPS.

Sendo que os animais receberam intraperitonealmente 10mL/kg de veículo (2% DMSO, 10% Tween 80, 88% salina) ou capsazepina (5 mg/Kg; N-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-2H-2-benzazepine-2-carbothioamide, Sigma Aldrich, Brasil) (NGUYEN et al., 2010) 30 minutos antes da administração de salina ou LPS (200 µg/Kg, i.p) e após 2 horas foram submetidos aos testes.

### 5.3.3 Campo aberto

O aparato específico para o teste é constituído de um círculo de acrílico de 30 cm de diâmetro com o piso subdividido em quadrantes centrais e periféricos. Os animais foram colocados no centro da arena e deixados livremente explorar o ambiente durante 5 minutos, tempo no qual eram filmados. As filmagens foram posteriormente analisadas avaliando-se a quantidade de cruzamentos centrais, periféricos, número total de cruzamentos, *rearings* (exploração vertical), *groomings* (autolimpeza) (BERNARDI, DE SOUZA, PALERMONETO, 1981), além dos tempos de imobilidade, em *rearing*, gasto para deixar o centro e o tempo total gasto nesta região (CHOLERIS et al., 2001). O aparato era limpo com álcool 10% após experimento com cada animal.

### **5.3.4 Claro-escuro**

O aparato é composto por uma caixa dividida em dois compartimentos: um com paredes pretas e uma tampa escura sobre a abertura superior; e um com paredes brancas e iluminação direta, sendo separados por uma divisória do tipo guilhotina, com uma porta central de 7,5 x 7,5 cm, ao nível do chão.

Os animais foram colocados individualmente no centro da parte iluminada do aparato, de frente para a abertura que leva ao lado escuro da caixa, sendo-lhe permitido explorar livremente os dois compartimentos durante os 5 minutos durante os quais eram filmados. Posteriormente foi analisado o tempo de permanência no compartimento claro, a latência para a entrada no compartimento escuro e o número de transições entre os compartimentos (atividade locomotora) (CRAWLEY, GOODWIN, 1980). O aparato era limpo com álcool 10% após experimento com cada animal.

### **5.3.5 Nado forçado**

O teste do nado forçado foi primeiramente proposto para ratos (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977) e então adaptado para camundongos (PORSOLT; DAIEL; JALFRE, 1978). O método consiste em colocar o animal em um béquer (12cm de diâmetro) contendo água limpa a aproximadamente 25°C durante 6 minutos, tempo em que foi feita filmagem. Após cada animal a água era substituída.

Foi então analisado o tempo que o animal permaneceu imóvel durante os 4 últimos minutos de teste.

### **5.3.6 Suspensão pela cauda**

O teste da suspensão pela cauda consiste em suspender o animal, prendendo a cauda com auxílio de uma fita adesiva (STERU et al., 1985). O animal foi observado por 5 minutos e foram registrados o tempo total de imobilidade e a latência para a primeira manifestação

desse comportamento (tempo gasto entre o início do teste e o primeiro episódio de imobilidade).

### **5.3.7 Ingestão alimentar e ganho de peso**

No período da manhã foram realizados os tratamentos e 2 horas após a administração de LPS ou salina foi reapresentado o alimento aos animais (6 horas de jejum prévio).

Antes do teste foi mensurado o peso da ração a ser oferecida a cada animal, que voltou a ser avaliado 2, 4, 6, 20, 22 e 24 horas após a reapresentação para a avaliação da ingestão alimentar, calculada a partir da diferença entre o peso inicial e o peso obtido a cada intervalo e normalizada de acordo com o peso do animal.

Para estudo da variação do peso corporal o animal foi pesado antes do início do experimento e 24 horas após os tratamentos.

### **5.3.8 Telemetria**

Foi feito implante de sensor para registro da temperatura interna e mobilidade dos animais com 6 a 7 dias de antecedência da realização do teste. Para tanto, sob efeito anestésico de 2,2,2 tribromoetanol 2,5% (TBE, i.p.; Sigma Aldrich, Brasil), foi feita incisão ventral de aproximadamente 2 cm, para possibilitar o acesso à cavidade peritoneal. Após a inserção do sensor (série 4000 E-Mitter; Mini Mitter, Bend, OR), o músculo abdominal e a pele do animal foram suturados e em seguida administrou-se antibiótico (Pentabiótico; Fort Dodge, Brasil). Após a recuperação completa da anestesia, com exposição à temperatura de 32°C, os camundongos foram isolados em gaiolas individuais com livre acesso à água e comida (CLEMENT; MILLS; BROCKWAY, 1989).

#### 5.3.8.1 Medida da temperatura interna

Após a inserção do sensor e completa recuperação dos animais (6 ou 7 dias após cirurgia), eles foram posicionados sobre uma placa receptora (Data Sciences) para coleta da temperatura interna e receberam administração das drogas, como citado anteriormente. As informações foram coletadas durante 8 horas e repassadas para o *software* (Vital View, Mini Mitter), que armazenou os dados.

Para determinação da temperatura basal calculou-se a média das temperaturas aferidas 30 minutos antes da primeira administração e a diferença entre a temperatura basal média e a temperatura obtida a cada intervalo foi calculada para obtenção da variação de temperatura (delta) (SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015).

#### 5.3.8.2 Medida da mobilidade

Os mesmos sensores citados anteriormente são capazes de captar a mobilidade do animal no interior da caixa. Sendo assim, após a administração das drogas, conjuntamente à temperatura, a quantidade de movimentos foi captada e enviada para o decodificador, que repassa as informações ao *software* (Vital View, Mini Mitter) que armazenou os dados (CLEMENT; MILLS; BROCKWAY, 1989).

### 5.3.9 Imunohistoquímica

Transcorridas duas horas da administração de LPS ou salina os animais foram submetidos à perfusão intracardíaca com tampão fosfato (PBS; pH 7,4) com heparina seguido de paraformaldeído 4% (Dinâmica, Brasil) em tampão fosfato. Após a remoção, o encéfalo foi imerso em solução fixadora e posteriormente transferidos para solução de sacarose 30% em PBS e mantidos a 4°C até o momento da realização dos cortes. Os encéfalos foram seccionados no plano coronal em 30µm de espessura utilizando-se criostato e os cortes

armazenados em solução anti-congelante a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do processamento imunohistoquímico.

Realizou-se então o bloqueio da peroxidase endógena durante trinta minutos sob agitação, seguida de lavagens (03) em PBS 0,01M. Foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com solução de albumina a 5% em PBS 0,1M sob agitação durante uma hora e posterior incubação de dezesseis a dezoito horas com anticorpos primários policlonais, anti-proteína c-Fos (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), diluído a 1:10000 em PBS 0,1M, contendo 2% de soro normal de cabra e 0,3% de Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Após lavagens (03) em PBS 0,01M foi realizada incubação por uma hora, em solução de anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) na diluição 1:200 e seguida de posterior lavagens (3) ocorreu a incubação dos cortes com o complexo avidina-biotina peroxidase, durante uma hora sob agitação.

A revelação dos cortes com 3,3 diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB), contendo peróxido de hidrogênio a 30% e intensificado com sulfato de níquel a 1% e cloreto de cobalto a 1% foi realizada seguida de lavagens com PBS 0,01M para interrupção do processo.

Em lâminas gelatinizadas foram montados os cortes e colocou-se lamínulas fixadas por Entellan (Merck, Alemanha). As células marcadas foram visualizadas em microscópio Nikon H55L e contadas para determinação do número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos nos núcleos paraventricular (PVN, do inglês *paraventricular nucleus*), supraóptico (SON, do inglês *supraoptic nucleus*), núcleo do leito da estria terminal (BNST do inglês *bed nucleus of the stria terminalis*) e área pré-ótica (POA, do inglês *preoptic area*).

#### **4.3.10 Dosagem de citocinas**

Os camundongos foram submetidos aos tratamentos conforme especificado anteriormente e passadas duas horas da última administração os animais tiveram o sangue coletado por meio de punção ocular (HOFF, 2000) em tubos heparinizados. O material biológico foi então centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para separação do plasma que foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o dia da dosagem.

As concentrações plasmáticas das citocinas (IL- $1\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) foram mensuradas através de ensaios enzimáticos (ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) usando kits comerciais (Peprotech, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

Microplacas com 96 orifícios (*High binding*, Costar, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura e posteriormente tiveram os sítios inespecíficos bloqueados com solução de albumina bovina. Após lavagem, as amostras ou padrões foram incubados para possibilitar a quantificação. Seguiu-se a adição de anticorpo de detecção, incubação com solução de avidina-peroxidase e posterior adição da solução cromogênica para leituras das reações colorimétricas que foram realizadas a 405nm em leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek). Cálculos foram realizados a partir da curva padrão para determinação das concentrações das amostras.

### **5.3.11 Avaliação da expressão proteica por *Western Blotting***

Transcorridas duas horas da aplicação de LPS ou salina, conforme esquema de tratamento mostrado anteriormente, os camundongos tiveram sangue coletado e extraído o cérebro para retirada do hipocampo e hipotálamo dos animais para avaliação da expressão proteica de TRPV1 pela técnica de *Western blotting*. As amostras foram mantidas a - 80°C até a data de processamento.

Os tecidos foram imersos em tampão de extração a quente, submetidos à fervura, homogeneizados em sonicador e centrifugados durante 35 minutos a 12000 rpm a 4 °C. A concentração de proteínas nos sobrenadantes foi determinada pelo método de Bradford a fim de ajustar todas as amostras para a mesma concentração proteica, diluindo os sobrenadantes com água destilada.

Foi feita padronização da quantidade proteica (30mg), diluição dos sobrenadantes em tampão Laemmli + ditioneitol (DTT) e esta solução submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida para separação das proteínas das amostras conforme originalmente descrito por Laemmli (1970).

Para a separação eletroforética das proteínas, foi aplicada voltagem inicial de 30V aumentada gradativamente até 120V e posteriormente as bandas proteicas foram transferidas eletroforéticamente a 15V para membrana de nitrocelulose.

A fim de comprovar a eficiência da transferência as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau e após lavagem rápida com solução basal para retirada do excesso de corante, os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana

foram bloqueados mediante incubação com solução a 5% de albumina, sob agitação constante durante uma hora.

A seguir, as membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpos primários específicos e após o término da incubação, as membranas foram lavadas (3 vezes) e incubadas com anticorpos secundários conjugados a enzimas durante duas horas. As membranas foram submetidas novamente a uma nova série de lavagens com solução basal, e as bandas imunorreativas reveladas por incubação com substratos específicos para emissão de quimioluminescência.

As imagens foram detectadas e digitalizadas no sistema Image Studio Digits versão 4.0 e as intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas por análise densitométrica pelo *software* do mesmo sistema.

#### 5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos resultados obtidos nos diversos experimentos, foi feita por meio do programa GraphPad Prism versão 6.0 e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para análise das diferentes doses de LPS foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, e nos demais, o pré-tratamento (efeito do veículo ou CPZ) e o tratamento (efeito da salina ou LPS) foram utilizados como fatores para análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós-teste Tukey para o estudo do sistema respiratório ou Newman-Keuls para o comportamento doentio. Os resultados com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos e estão detalhadamente descritos.

## 6 RESULTADOS

Os resultados do estudo estão apresentados a seguir.

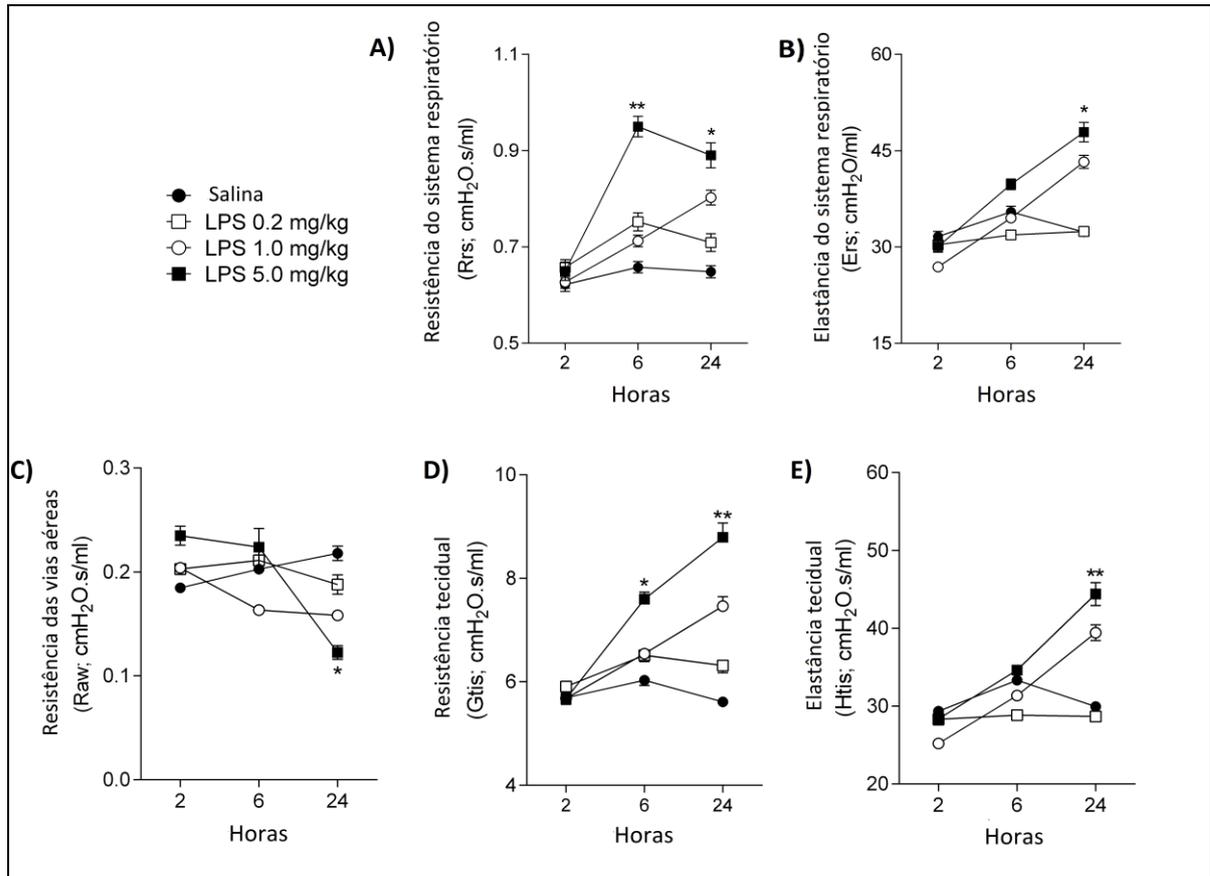
### 6.1 TRPV1 E O SISTEMA RESPIRATÓRIO

A participação dos receptores TRPV1 na LPA/SDRA foi estudada, conforme resultados expostos na sequência.

#### 6.1.1 Efeito da administração de LPS na mecânica respiratória

Como mostrado graficamente na figura 01, apenas a dose de 5,0 mg/kg de LPS foi capaz de, quando experimento realizado 6 e 24 horas após tratamento, promover aumento da resistência do sistema respiratório ( $p < 0,01$  6h após tratamento e  $p < 0,05$  transcorridas 24h; fig 1A) e da resistência tecidual ( $p < 0,05$  transcorridas 6h do tratamento e  $p < 0,01$  24h após o mesmo; fig 1D), além de aumentar a elastância do sistema respiratório ( $p < 0.001$ ; fig 1B), a elastância tecidual ( $p < 0.01$ ; fig 1E) e reduzir a resistência das vias aéreas ( $p < 0.05$ ; fig 1C) 24 horas após a administração quando comparado ao grupo salina analisado após mesmo período de tempo. As demais doses de LPS não foram capazes de provocar alterações nos parâmetros analisados.

Figura 1- Efeito da administração (i.p.) de salina ou LPS (0,2; 1,0 ou 5,0 mg/kg) na mecânica respiratória.

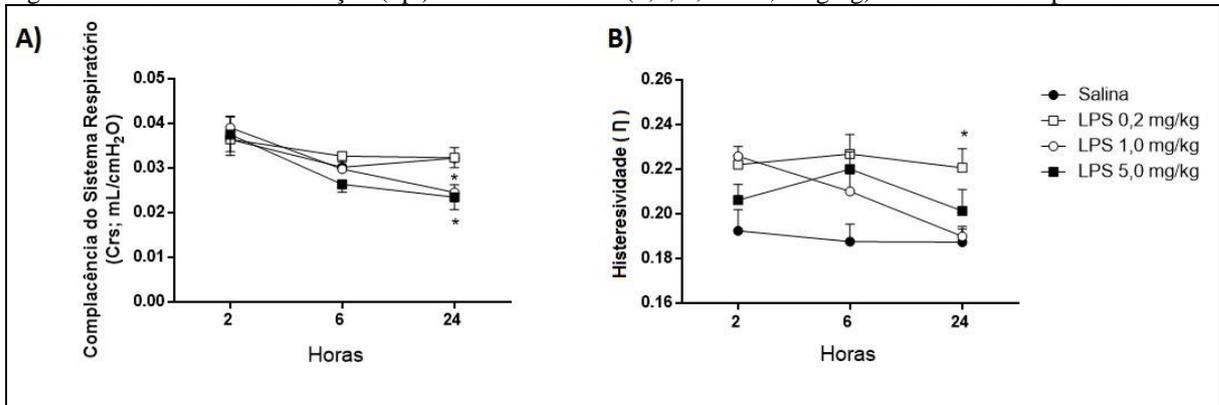


Nota: 10-12 camundongos por grupo/tempo, onde A) Resistência do sistema respiratório ( $R_{rs}$ ), B) elastância do sistema respiratório ( $E_{rs}$ ), C) Resistência das vias aéreas ( $R_{aw}$ ), D) Resistência tecidual ( $G_{tis}$ ) e E) Elastância tecidual ( $H_{tis}$ ). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. Os símbolos representam níveis de significância: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo controle (salina) no mesmo tempo de análise.

Fonte: Da autora.

Foram analisadas também as alterações promovidas na complacência do sistema respiratório e na histeresividade e foi possível observar que 24 horas após a administração dos tratamentos os animais que receberam as doses de 5,0 e 1,0mg/kg de LPS tiveram complacência reduzida quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$  em ambos; Fig 2A) e a histeresividade mostrou-se aumentada no grupo LPS 0,2 mg/kg quando comparado ao grupo salina ( $p < 0,05$ ).

Figura 2 - Efeito da administração (i.p.) de salina ou LPS (0,2; 1,0 ou 5,0 mg/kg) na mecânica respiratória.



Nota: 10-12 camundongos por grupo/tempo. A) Complacência do sistema respiratório (Crs) e B) Histeresividade (η). Cada ponto representa a média ± EPM. O símbolo representa nível de significância: \* $p < 0.05$  comparado ao grupo controle (salina).

Fonte: Da autora

A análise estatística dos resultados apresentados anteriormente, que está detalhadamente apresentada na tabela 02, foi realizada de forma isolada em cada tempo estudado pela ANOVA de uma vida e pós teste de Tukey.

Tabela 02 - Análise estatística das diferentes doses de LPS na mecânica respiratória

<b>2 horas</b>					
	<b>Salina</b>	<b>0,2 mg/kg</b>	<b>1,0 mg/kg</b>	<b>5,0 mg/kg</b>	<b>F</b>
<b>R<sub>Rs</sub></b>	0,62±0,05	0,66±0,06	0,63±0,05	0,65±0,07	F <sub>3,44</sub> = 0,87; p = 0,46
<b>E<sub>Rs</sub></b>	31,61±2,85	30,35±2,80	26,88±1080	30,08±3,17	F <sub>3,44</sub> = 0,56; p = 0,65
<b>C<sub>Rs</sub></b>	0,04±0,005	0,04±0,004	0,04±0,003	0,04±0,004	F <sub>3,44</sub> = 0,10; p = 0,96
<b>R<sub>aw</sub></b>	0,21±0,03	0,20±0,02	0,19±0,03	0,23±0,03	F <sub>3,44</sub> = 0,42; p = 0,74
<b>G<sub>tis</sub></b>	5,55±0,48	6,26±0,56	5,68±0,33	5,67±0,41	F <sub>3,44</sub> = 0,49; p = 0,69
<b>H<sub>tis</sub></b>	29,37±2,51	28,31±2,62	25,21±1,50	28,36±2,80	F <sub>3,44</sub> = 0,56; p = 0,65
<b>η</b>	0,19±0,01	0,22±0,004	0,23±0,004	0,21±0,01	F <sub>3,44</sub> = 5,33; p < 0,01
<b>6 horas</b>					
<b>R<sub>Rs</sub></b>	0,66±0,04	0,75±0,05	0,71±0,04	0,95±0,07	F <sub>3,42</sub> = 4,99; p < 0,01
<b>E<sub>Rs</sub></b>	35,46±3,05	31,87±1,93	34,50±1,85	39,75±2,80	F <sub>3,42</sub> = 1,73; p = 0,17
<b>C<sub>Rs</sub></b>	0,03±0,002	0,03±0,002	0,03±0,002	0,03±0,002	F <sub>3,42</sub> = 1,87; p = 0,15
<b>R<sub>aw</sub></b>	0,20±0,01	0,21±0,03	0,16±0,01	0,22±0,06	F <sub>3,42</sub> = 0,55; p = 0,65
<b>G<sub>tis</sub></b>	6,03±0,35	6,51±0,43	6,54±0,32	7,60±0,45	F <sub>3,42</sub> = 2,81; p = 0,05
<b>H<sub>tis</sub></b>	33,34±3,18	28,84±1,71	31,35±1,56	34,65±1,89	F <sub>3,42</sub> = 1,31; p = 0,28
<b>η</b>	0,19±0,01	0,23±0,01	0,21±0,01	0,22±0,01	F <sub>3,42</sub> = 4,57; p < 0,01
<b>24 horas</b>					
<b>R<sub>Rs</sub></b>	0,65±0,04	0,71±0,05	0,80±0,05	0,89±0,08	F <sub>3,41</sub> = 2,86; p < 0,01
<b>E<sub>Rs</sub></b>	32,31±1,76	32,43±2,23	43,25±3,50	47,90±5,11	F <sub>3,41</sub> = 5,23; p < 0,001
<b>C<sub>Rs</sub></b>	0,03±0,002	0,03±0,002	0,02±0,002	0,02±0,003	F <sub>3,41</sub> = 4,41; p < 0,01
<b>R<sub>aw</sub></b>	0,22±0,02	0,19±0,03	0,16±0,02	0,12±0,02	F <sub>3,41</sub> = 3,01; p < 0,05
<b>G<sub>tis</sub></b>	5,61±0,31	6,31±0,46	7,46±0,64	8,79±0,91	F <sub>3,41</sub> = 4,93; p < 0,01
<b>H<sub>tis</sub></b>	29,95±1,46	28,68±1,87	39,44±3,49	44,39±4,88	F <sub>3,41</sub> = 5,36; p < 0,01
<b>η</b>	0,19±0,006	0,22±0,009	0,19±0,005	0,20±0,01	F <sub>3,41</sub> = 4,19; p < 0,05

Nota: Valores expressos como média ± EPM. Resistência do sistema respiratório (R<sub>rs</sub>), elastância do sistema respiratório (E<sub>rs</sub>), Complacência do sistema respiratório (C<sub>rs</sub>), Resistência das vias aéreas (R<sub>aw</sub>), Resistência tecidual (G<sub>tis</sub>), Elastância tecidual (H<sub>tis</sub>) e Histeresividade (η).

Fonte: Da autora

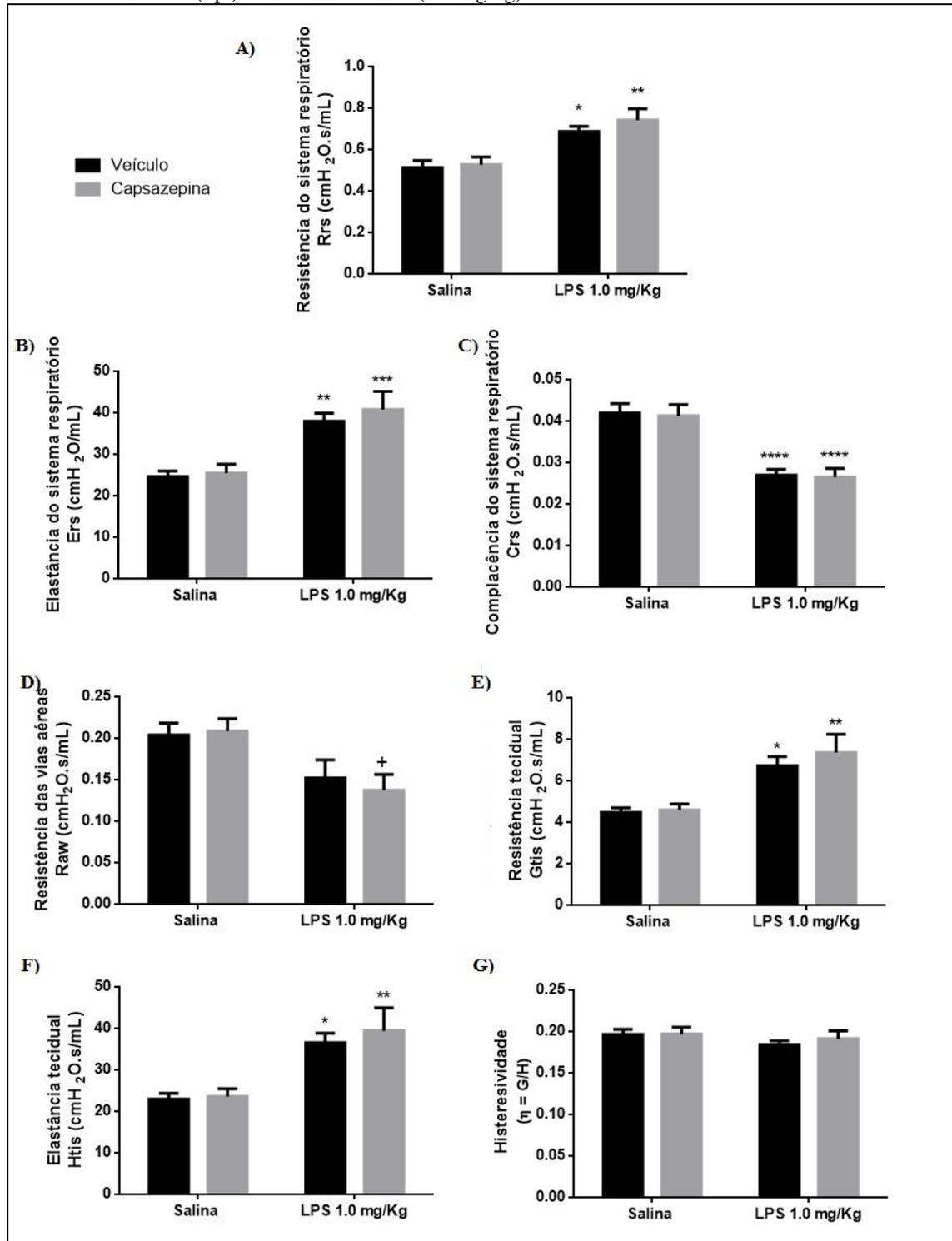
Sendo assim, definiu-se o tempo de 24horas após a administração do LPS como o mais adequado para o estudo das alterações na mecânica respiratória.

### **6.1.2 Efeito do pré-tratamento com CPZ na mecânica respiratória de camundongos com LPA**

Iniciamos o estudo da participação dos receptores TRPV1 na mecânica respiratória por meio da avaliação do efeito do LPS 1,0mg/Kg e o bloqueio dos receptores TRPV1 por meio da capsazepina (15mg/kg) sendo a análise feita 24 horas após a última aplicação.

Como é possível observar na figura 3 e na análise estatística apresentada na tabela 03, o bloqueio do receptor TRPV1 não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros analisados quando administrado em conjunto com LPS na dose de 1,0 mg/kg, entretanto o LPS provocou aumento nos grupos pré-tratados com veículo e CPZ da Rrs ( $p<0,05$  e  $p<0,01$  respectivamente), na Ers ( $p<0,01$  e  $p<0,001$  respectivamente), Gtis ( $p<0,05$  e  $p<0,01$  respectivamente) e Htis ( $p<0,05$  e  $p<0,01$  respectivamente), além de diminuição da Crs ( $p<0,0001$  em ambos) quando comparados ao grupo veículo+salina. A Raw foi diminuída ( $p<0,05$ ) nos animais pré-tratados com CPZ e tratados com LPS comparando animais que receberam o mesmo pré-tratamento e administração de salina.

Figura 3 - Efeito do pré-tratamento (s.c.) com veículo ou CPZ na mecânica respiratória dos camundongos tratados (i.p.) com salina ou LPS (1.0 mg/kg).



Nota: A) Resistência do sistema respiratório (R<sub>rs</sub>), B) elastância do sistema respiratório (E<sub>rs</sub>), C) Complacência do sistema respiratório (C<sub>rs</sub>), D) Resistência das vias aéreas (R<sub>aw</sub>), E) Resistência tecidual (G<sub>tis</sub>), F) Elastância tecidual (H<sub>tis</sub>) e G) Histeresividade (η). Cada barra representa a média ± EPM (n= 10-12 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001 e \*\*\*\**p* < 0,0001 comparados ao grupo controle (veículo+salina) e +*p* < 0,05 quando comparado ao grupo CPZ+salina.

Fonte: Da autora

A análise estatística apresentada a seguir corresponde à avaliação da participação dos receptores TRPV1 na mecânica respiratória dos camundongos que foi feita pela ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey, na qual a administração de veículo ou capsazepina corresponde à variável pré-tratamento e a aplicação de salina ou LPS (1,0 mg/kg) ao tratamento.

Tabela 03 - Análises de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com CPZ ou veículo e submetidos a tratamento com salina ou LPS 1,0 mg/kg na mecânica respiratória.

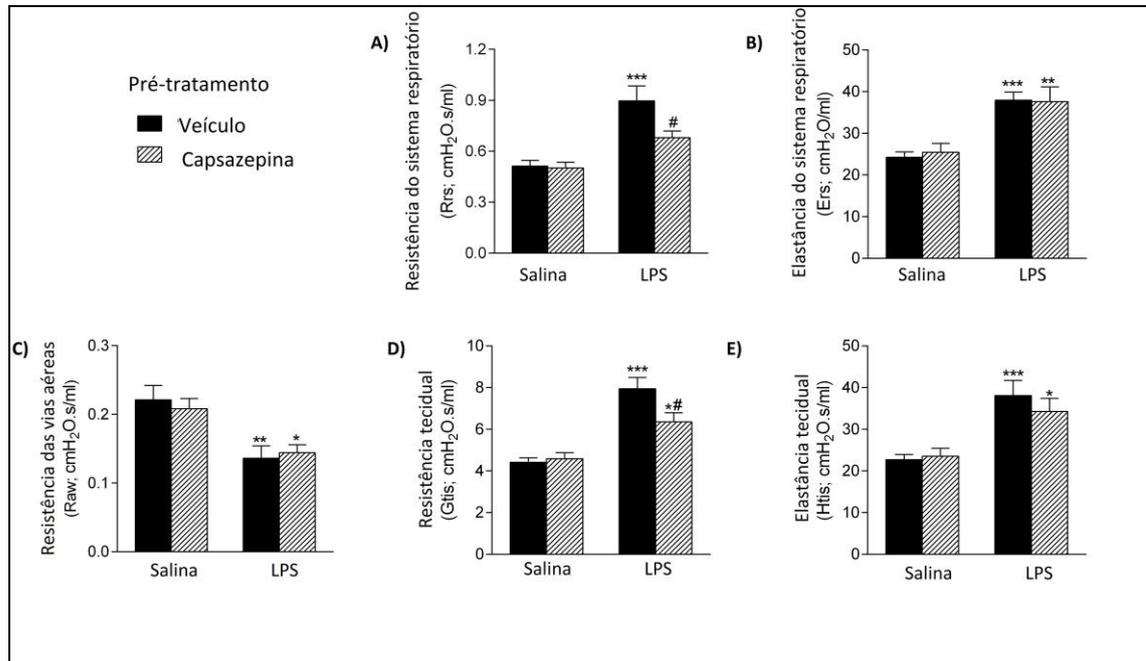
	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
<b>R<sub>RS</sub></b>	$F_{1,37} = 0,74; p = 0,39$	$F_{1,37} = 24,51; p < 0,0001$	$F_{1,37} = 0,28; p = 0,60$
<b>E<sub>RS</sub></b>	$F_{1,37} = 0,49; p = 0,49$	$F_{1,37} = 29,19; p < 0,0001$	$F_{1,37} = 0,14; p = 0,71$
<b>C<sub>RS</sub></b>	$F_{1,37} = 0,08; p = 0,77$	$F_{1,37} = 47,63; p < 0,0001$	$F_{1,37} = 0,002; p = 0,96$
<b>R<sub>aw</sub></b>	$F_{1,37} = 0,08; p = 0,77$	$F_{1,37} = 11,98; p = 0,0014$	$F_{1,37} = 0,29; p = 0,59$
<b>G<sub>tis</sub></b>	$F_{1,37} = 0,52; p = 0,47$	$F_{1,37} = 22,72; p < 0,0001$	$F_{1,37} = 0,25; p = 0,62$
<b>H<sub>tis</sub></b>	$F_{1,37} = 0,30; p = 0,58$	$F_{1,37} = 21,52; p < 0,0001$	$F_{1,37} = 0,1253; p = 0,73$
<b>η</b>	$F_{1,37} = 0,30; p = 0,59$	$F_{1,37} = 1,52; p = 0,23$	$F_{1,37} = 0,20; p = 0,66$

Nota: Resistência do sistema respiratório (R<sub>rs</sub>), elastância do sistema respiratório (E<sub>rs</sub>), Complacência do sistema respiratório (C<sub>rs</sub>), Resistência das vias aéreas (R<sub>aw</sub>), Resistência tecidual (G<sub>tis</sub>), Elastância tecidual (H<sub>tis</sub>) e Histeresividade (η).

Fonte: Da autora

Ao ser avaliada a mecânica respiratória dos camundongos 24 horas após a última aplicação, a administração de LPS 5,0mg/kg, como mostra a figura 4, foi capaz de promover aumento da R<sub>rs</sub> ( $p < 0,001$ ) nos animais pré-tratados com veículo e de E<sub>rs</sub> ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ ), G<sub>tis</sub> ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ) e H<sub>tis</sub> ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ) nos animais pré-tratados com veículo e CPZ respectivamente, além de promover a redução de R<sub>aw</sub> em ambos ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  respectivamente) quando comparados ao grupo controle (veículo+salina); nota-se também que o pré-tratamento com capsazepina preveniu o aumento na resistência sistêmica - R<sub>rs</sub> ( $p < 0,05$ ; fig 4A) além de diminuir o aumento da resistência tecidual G<sub>tis</sub> provocado pelo LPS ( $p < 0,05$ ; fig 4D). Entretanto, o bloqueio dos receptores TRPV1 não promoveu nenhuma alteração na elastância do sistema respiratório (fig 4B), elastância tecidual (fig 4E) e resistência das vias aéreas (fig 4C) nos animais tratados também com LPS.

Figura 4 - Efeito do pré-tratamento (s.c.) com veículo ou CPZ na mecânica respiratória dos camundongos tratados (i.p.) com salina ou LPS (5,0 mg/kg).

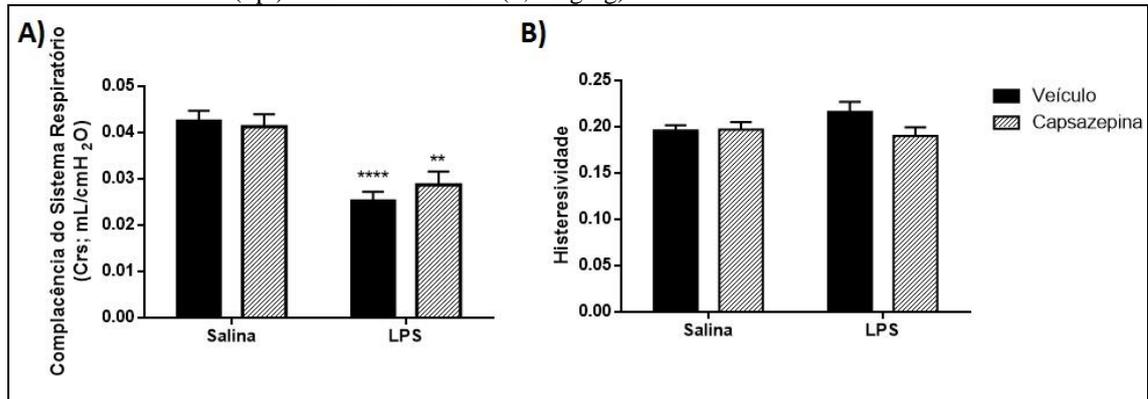


Nota: 10 animais por grupo. A) Resistência do sistema respiratório ( $R_{rs}$ ), B) elastância do sistema respiratório ( $E_{rs}$ ), C) Resistência das vias aéreas ( $R_{aw}$ ), D) Resistência tecidual ( $G_{tis}$ ) e E) Elastância tecidual ( $H_{tis}$ ). As barras representam a média  $\pm$  EPM. Os símbolos representam níveis de significância: \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao grupo controle (veículo+salina); # $p < 0,05$  comparado ao grupo veículo+LPS.

Fonte: Da autora

Já a figura 5 mostra que a administração de LPS 5,0 mg/kg foi capaz de reduzir a  $C_{rs}$  (A) dos animais pré-tratados com veículo e capsazepina ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$  respectivamente) quando comparados aos animais controle (veículo+salina), mostrando assim que o bloqueio dos receptores TRPV1 não promoveu alterações na complacência diante da administração de endotoxina ou mesmo de veículo (salina). A histeresividade (fig 5B), por sua vez, não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos estudados.

Figura 5 - Efeito do pré-tratamento (s.c.) com veículo ou CPZ na mecânica respiratória dos camundongos tratados (i.p.) com salina ou LPS (5,0 mg/kg).



Nota: A) Complacência do sistema respiratório (C<sub>rs</sub>), B) Histeresividade. As barras representam a média ± EPM (n= 10 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\**p* < 0,01 e \*\*\*\**p* < 0,0001 comparados ao grupo controle (veículo+salina).

Fonte: Da autora

Todavia, em todos os estudos mostrados, a CPZ não promoveu nenhuma alteração quando administrada em conjunto com salina, mostrando que o bloqueio dos receptores não é capaz de promover alterações na mecânica respiratória dos animais na ausência do estímulo danoso produzido pelo LPS, conforme análise estatística feita por meio de ANOVA de duas vias e pós teste de Tukey apresentada detalhadamente na tabela 04, na qual o pré-tratamento corresponde à administração de veículo ou capsazepina e o tratamento a aplicação de salina ou LPS.

Tabela 04 - Análises de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com CPZ ou veículo e submetidos a tratamento com salina ou LPS 5,0 mg/kg na mecânica respiratória.

	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
<b>R<sub>rs</sub></b>	$F_{1,37} = 4,15; p < 0,05$	$F_{1,37} = 31,3; p < 0,001$	$F_{1,37} = 5,08; p < 0,05$
<b>E<sub>rs</sub></b>	$F_{1,37} = 0,11; p = 0,73$	$F_{1,37} = 33,2; p < 0,001$	$F_{1,37} = 0,03; p = 0,84$
<b>C<sub>rs</sub></b>	$F_{1,37} = 0,19; p = 0,67$	$F_{1,37} = 38,62; p < 0,001$	$F_{1,37} = 0,95; p = 0,34$
<b>R<sub>aw</sub></b>	$F_{1,37} = 0,35; p = 0,55$	$F_{1,37} = 17,6; p < 0,001$	$F_{1,37} = 0,02; p = 0,88$
<b>G<sub>tis</sub></b>	$F_{1,37} = 3,50; p = 0,06$	$F_{1,37} = 48,6; p < 0,001$	$F_{1,37} = 5,39; p < 0,05$
<b>H<sub>tis</sub></b>	$F_{1,37} = 0,86; p = 0,35$	$F_{1,37} = 48,6; p < 0,001$	$F_{1,37} = 0,33; p = 0,56$
<b>η</b>	$F_{1,37} = 2,15; p = 0,15$	$F_{1,37} = 0,60; p = 0,44$	$F_{1,37} = 2,50; p = 0,12$

Nota: Resistência do sistema respiratório (R<sub>rs</sub>), elastância do sistema respiratório (E<sub>rs</sub>), Complacência do sistema respiratório (C<sub>rs</sub>), Resistência das vias aéreas (R<sub>aw</sub>), Resistência tecidual (G<sub>tis</sub>), Elastância tecidual (H<sub>tis</sub>) e Histeresividade (η).

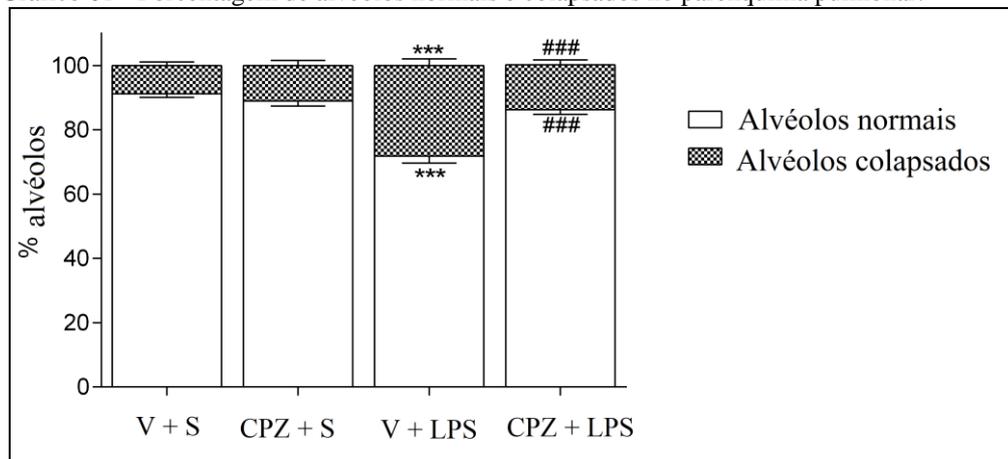
Fonte: Da autora

Sendo assim, quando avaliada após 24 da administração a dose de 5,0 mg/kg de LPS foi definida como mais adequada para o estudo da participação dos receptores TRPV1 na LPA e, portanto, foi utilizada nas demais análises.

### 6.1.3 Análise do parênquima pulmonar

É possível observar no gráfico 1 que os animais que receberam LPS apresentaram aumento ( $p < 0,001$ ) na porcentagem de alvéolos colapsados, com consequente diminuição na porcentagem de normais ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo controle, e o bloqueio dos receptores TRPV1 diminuiu a porcentagem de alvéolos colapsados ( $p < 0,001$ ) com consequente aumento dos normais ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo tratado com veículo e LPS.

Gráfico 01 - Porcentagem de alvéolos normais e colapsados no parênquima pulmonar.



Nota: Camundongos pré-tratados (s.c.) com veículo (V) ou capsazepina (CPZ) e subseqüente tratamento (i.p.) com salina (S) ou LPS (5,0 mg/kg). Retirada do tecido 24 horas após a última administração. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 10 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\*\* $p < 0.001$  comparados ao grupo controle (V+S); ### $p < 0.001$  comparado ao grupo V+LPS.

Fonte: Da autora

A tabela 05 detalha a análise estatística dos resultados supracitados, em que foi utilizada ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey com pré-tratamento definido pela administração de veículo ou CPZ e tratamento pela aplicação de salina ou LPS (5,0mg/kg).

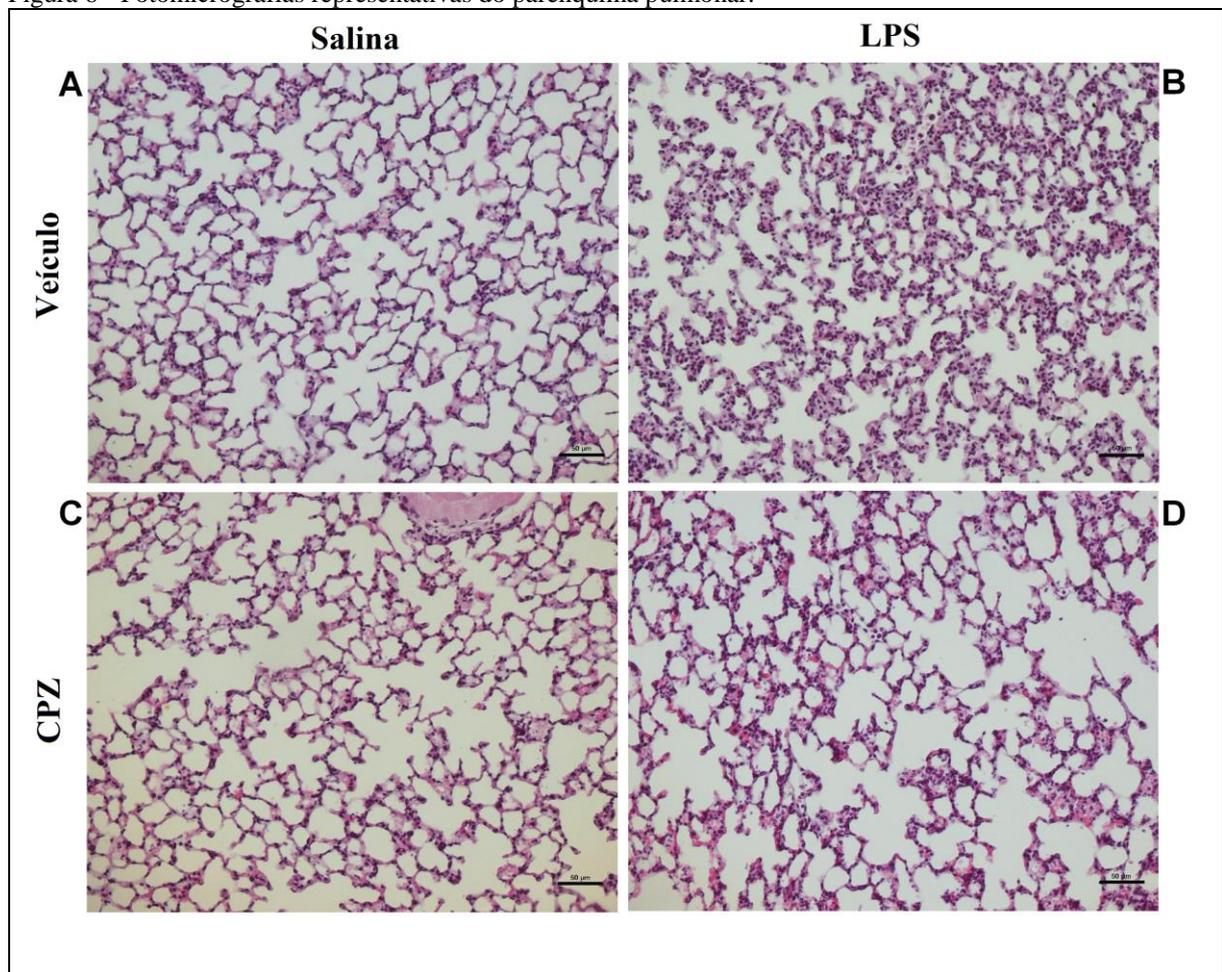
Tabela 05 - Análises dos grupos pré-tratados com CPZ ou veículo e submetidos a tratamento com salina ou LPS na porcentagem de alvéolos colapsados e normais.

	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
<b>Normais</b>	$F_{1,32} = 12,5; p < 0,01$	$F_{1,32} = 42,3; p < 0,001$	$F_{1,32} = 23,4; p < 0,001$
<b>Colapsados</b>	$F_{1,32} = 12,4; p < 0,01$	$F_{1,32} = 43,0; p < 0,001$	$F_{1,32} = 23,2; p < 0,001$

Fonte: Da autora

Tais alterações são também observadas na figura 6, em que são apresentadas fotomicrografias representativas do tecido pulmonar corado com hematoxilina-eosina.

Figura 6 - Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar.



Nota: A) Veículo + salina; B) Veículo +LPS; C) CPZ + salina; D) CPZ + LPS. Coloração com hemotoxilina-eosina e aumento x200. As barras correspondem 50µm.

Fonte: Da autora

Em relação à análise da celularidade no parênquima foi quantificada a presença de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) no tecido. Entretanto, conforme apresentado na tabela 06, não observou-se diferenças entre os grupos estudados, mesmo embora as alterações teciduais fossem perceptíveis como mostrado nas imagens da figura 6.

Tabela 06 - Porcentagem de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) no tecido pulmonar.

<b>Grupos</b>	<b>% PMN</b>	<b>% MN</b>	<b>% Células totais</b>
<b>Veículo+Salina</b>	0,073 ± 0,073	1,785 ± 0,193	1,859 ± 0,216
<b>Capsazepina + Salina</b>	0,000 ± 0,000	3,472 ± ,337	2,990 ± 0,794
<b>Veículo + LPS</b>	0,398 ± 0,108	2,990 ± 0,794	3,870 ± 0,360
<b>Capsazepina + LPS</b>	0,302 ± 0,251	2,532 ± 0,618	2,834 ± 0,854

Nota: Avaliação feita em 10 campos randomizados e não coincidentes por animal. Valores expressos como média ± EPM.

Fonte: Da autora.

Sendo que a tabela 07 apresenta de forma detalhada a análise estatística da celularidade, em que foi utilizado o teste de ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey no qual o pré-tratamento foi tomado como a administração de veículo ou CPZ e o tratamento a aplicação de salina ou LPS (5,0mg/kg).

Tabela 07 - Análise de variância de duas vias na porcentagem de células polimorfonucleares (PMN) e de mononucleares (MN) no tecido pulmonar entre os grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS.

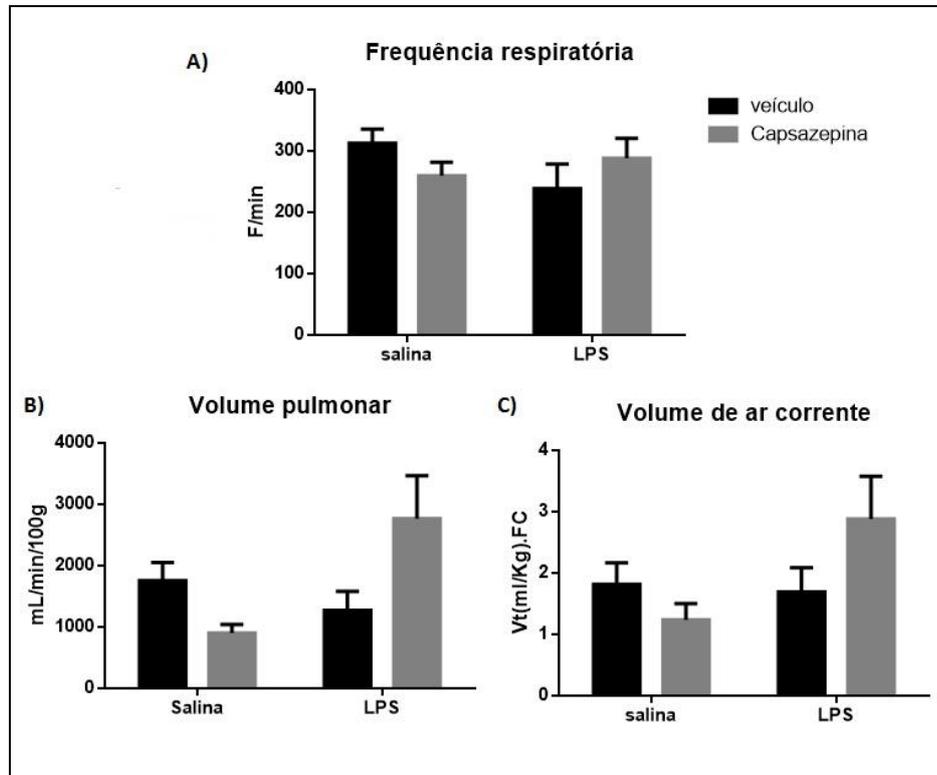
	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
<b>PMN</b>	$F_{1,18} = 0,36; p = 0,55$	$F_{1,18} = 3,09; p = 0,10$	$F_{1,18} = 0,04; p = 0,84$
<b>MN</b>	$F_{1,18} = 1,69; p = 0,21$	$F_{1,18} = 0,37; p = 0,55$	$F_{1,18} = 3,28; p = 0,09$
<b>Células totais</b>	$F_{1,18} = 1,04; p = 0,32$	$F_{1,18} = 0,69; p = 0,42$	$F_{1,18} = 2,40; p = 0,14$

Fonte: Da autora

#### 6.1.4 Pletismografia de corpo inteiro

A figura 7 nos mostra que não foi possível observar diferenças na frequência respiratória, volume pulmonar e volume de ar corrente entre os grupos estudados.

Figura 7 - Efeito do pré-tratamento (s.c.) com veículo ou CPZ em camundongos tratados com salina ou LPS (5.0 mg/kg, i.p.) na pletismografia de corpo inteiro.



Nota: Frequência respiratória (A), volume pulmonar (B) e volume de ar corrente (C) de camundongos tratados com salina apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 5-9 camundongos por grupo).

Fonte: Da autora.

A análise estatística apresentada em detalhe na tabela 08 mostra que pelo teste de ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, sendo tomado como variável pré-tratamento a aplicação de veículo ou CPZ e tratamento a administração de salina e LPS (5,0mg/kg).

Tabela 08 - Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS nos dados da pletismografia de corpo inteiro.

	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
<b>Frequência</b>	$F_{1,24}=0,005; p = 0,95$	$F_{1,24} = 0,57; p = 0,46$	$F_{1,24}=2,92; p = 0,10$
<b>V. pulmonar</b>	$F_{1,24}=0,0002; p= 0,99$	$F_{1,24} = 1,43; p = 0,24$	$F_{1,24} = 7,57; p = 0,01$
<b>V. corrente</b>	$F_{1,24}=0,007; p= 0,93$	$F_{1,24} = 1,68; p = 0,21$	$F_{1,24} = 2,81; p = 0,11$

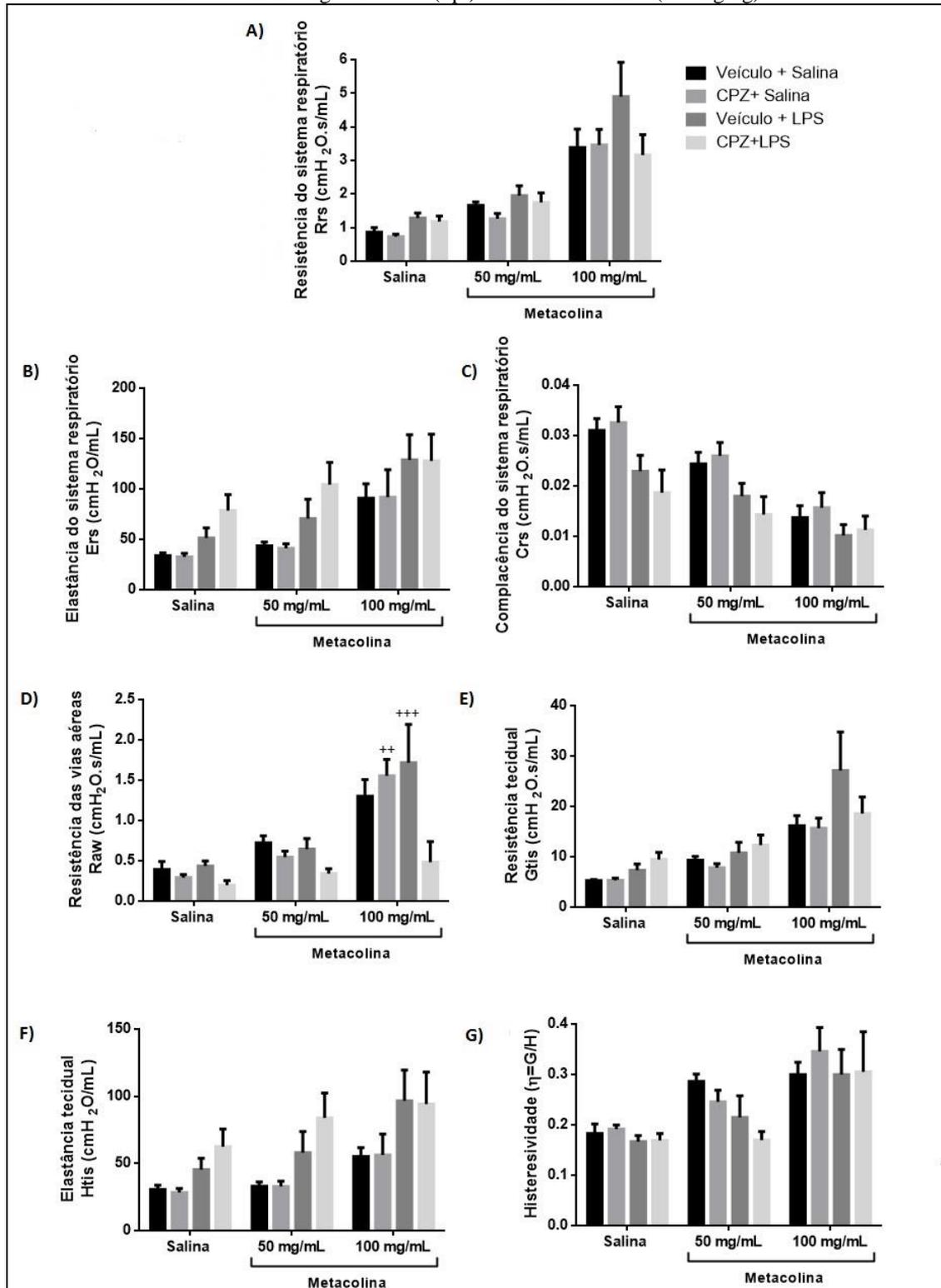
Fonte: Da autora

### **6.1.5 Análise da responsividade das vias aéreas**

Os resultados revelam aumento da resistência das vias aéreas ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  respectivamente) nos grupos tratados com CPZ+salina e LPS+veículo quando comparados ao grupo CPZ+LPS após a nebulização de metacolina 100 mg/mL.

Demais parâmetros não apresentaram diferenças entre os grupos estudados diante do mesmo estímulo, conforme mostra a figura 8.

Figura 8 - Efeito do pré-tratamento (s.c.) com veículo ou CPZ na mecânica respiratória com desafio de metacolina de camundongos tratados (i.p.) com salina ou LPS (5.0 mg/kg).



Nota:  $R_{rs}$  (A),  $E_{rs}$  (B),  $C_{rs}$  (C),  $R_{aw}$  (D),  $G_{tis}$  (E),  $H_{tis}$  (F) e  $\eta$  (G). Cada barra representa a média  $\pm$  EPM (n= 8-10 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância:  $++p < 0.01$ ,  $+++p < 0.001$  comparados ao grupo capsazepina + LPS com nebulização de 100mg/mL de metacolina.

Fonte: Da autora.

A tabela 09 apresenta a análise estatística detalhada, feita pela ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey em que a variável tratamento corresponde à aplicação de veículo ou CPZ seguida de salina ou LPS e a variável denominada metacolina corresponde à administração do broncoconstritor.

Tabela 09 - Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS na mecânica respiratória com desafio de metacolina.

	<b>Tratamento</b>	<b>Metacolina</b>	<b>Interação</b>
<b>R<sub>Rs</sub></b>	$F_{3,81} = 2,52; p = 0,06$	$F_{2,81} = 45,88; p < 0,0001$	$F_{6,81} = 0,86; p = 0,53$
<b>E<sub>Rs</sub></b>	$F_{3,81} = 6,06; p = 0,0009$	$F_{2,81} = 14,17; p < 0,0001$	$F_{6,81} = 0,26; p = 0,95$
<b>C<sub>Rs</sub></b>	$F_{3,81} = 7,86; p = 0,0001$	$F_{2,81} = 21,52; p < 0,0001$	$F_{6,81} = 0,70; p = 0,65$
<b>R<sub>aw</sub></b>	$F_{3,81} = 6,18; p = 0,0008$	$F_{2,81} = 28,38; p < 0,0001$	$F_{6,81} = 2,03; p = 0,07$
<b>G<sub>tis</sub></b>	$F_{3,81} = 2,89; p = 0,04$	$F_{2,81} = 24,98; p < 0,0001$	$F_{6,81} = 1,09; p = 0,37$
<b>H<sub>tis</sub></b>	$F_{3,81} = 7,15; p = 0,0003$	$F_{2,81} = 6,73; p = 0,002$	$F_{6,81} = 0,32; p = 0,92$
<b>η</b>	$F_{3,81} = 1,24; p = 0,30$	$F_{2,81} = 14,95; p < 0,0001$	$F_{6,81} = 0,69; p = 0,66$

Nota: Resistência do sistema respiratório (R<sub>rs</sub>), elastância do sistema respiratório (E<sub>rs</sub>), Complacência do sistema respiratório (C<sub>rs</sub>), Resistência das vias aéreas (R<sub>aw</sub>), Resistência tecidual (G<sub>tis</sub>), Elastância tecidual (H<sub>tis</sub>) e Histeresividade (η).

Fonte: Da autora

### 6.1.6 Análise da mortalidade

Analisou-se a mortalidade decorrente da administração sistêmica de LPS (5,0 mg/kg) bem como o efeito do bloqueio dos receptores TRPV1 por meio da análise de qui-quadrado, demonstrando a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos ( $p=0,2876$  e  $z=1,063$ ) como exposto na tabela 10, em que são apresentadas as porcentagens de mortalidade de cada um dos grupos estudados.

Tabela 10 - Porcentagem de mortalidade após 24 horas do tratamento intraperitoneal com LPS ou salina e pré-tratamento com veículo ou CPZ.

<b>Grupos</b>	<b>% mortalidade</b>
<b>Veículo + Salina</b>	0%
<b>Veículo + LPS</b>	16,67 %
<b>Capsazepina + Salina</b>	0%
<b>Capsazepina + LPS</b>	7,41%

Fonte: Da autora

## 6.2 TRPV1 E O COMPORTAMENTO DOENTIO

A participação do TRPV1 na modulação do comportamento doentio foi estudada conforme resultados apresentados a seguir.

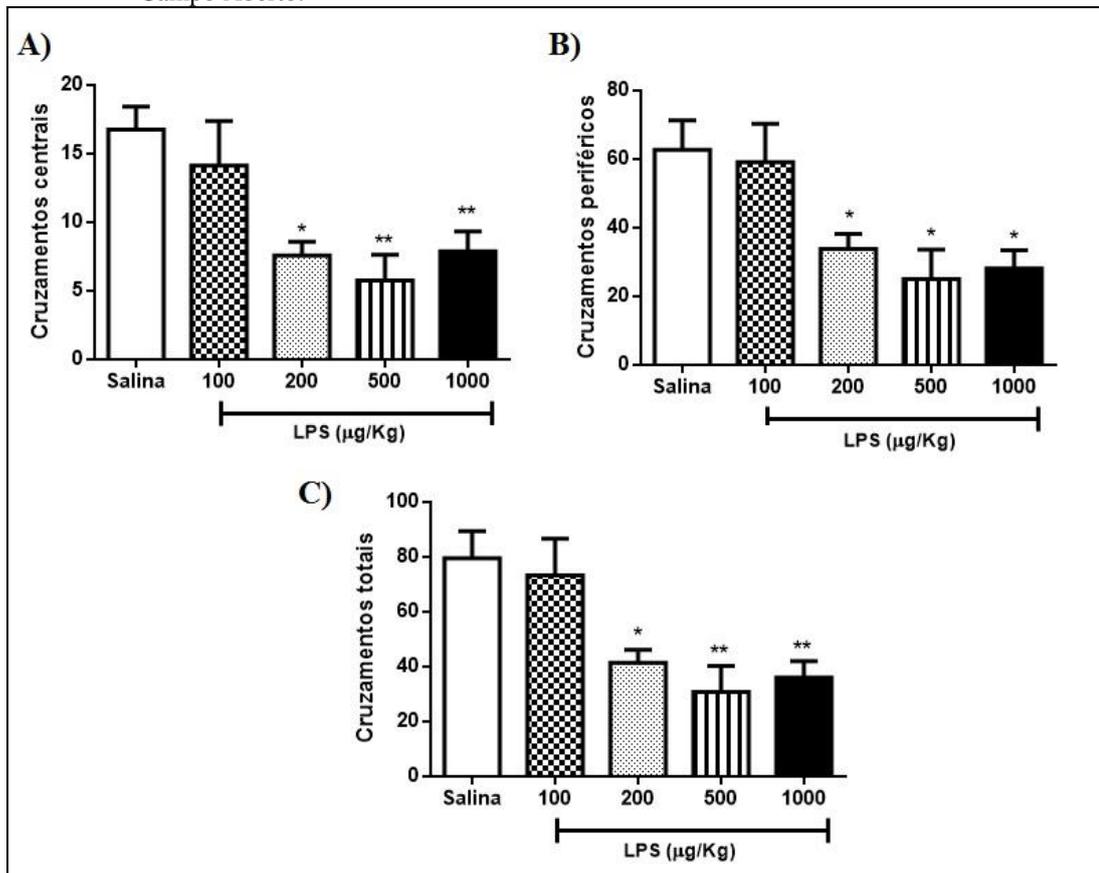
### 6.2.1 Efeito da administração de LPS no comportamento doentio

Os resultados da avaliação do comportamento doentio frente a administração de LPS são descritos a seguir, estando as análises estatísticas detalhadas nas tabelas.

#### 6.2.1.1 Campo Aberto

Como mostrado na figura 09, quando avaliados 2 horas após o tratamento, os camundongos que receberam as doses de 200, 500 e 1000 µg/kg de LPS foram capazes de reduzir o número de cruzamentos centrais ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,01$ , respectivamente), periféricos ( $p < 0,05$  para todos os grupos) e totais ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,01$ , respectivamente) quando comparados ao grupo que recebeu administração de salina i.p..

Figura 09 – Efeito após 2h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 µg/kg) no Campo Aberto.

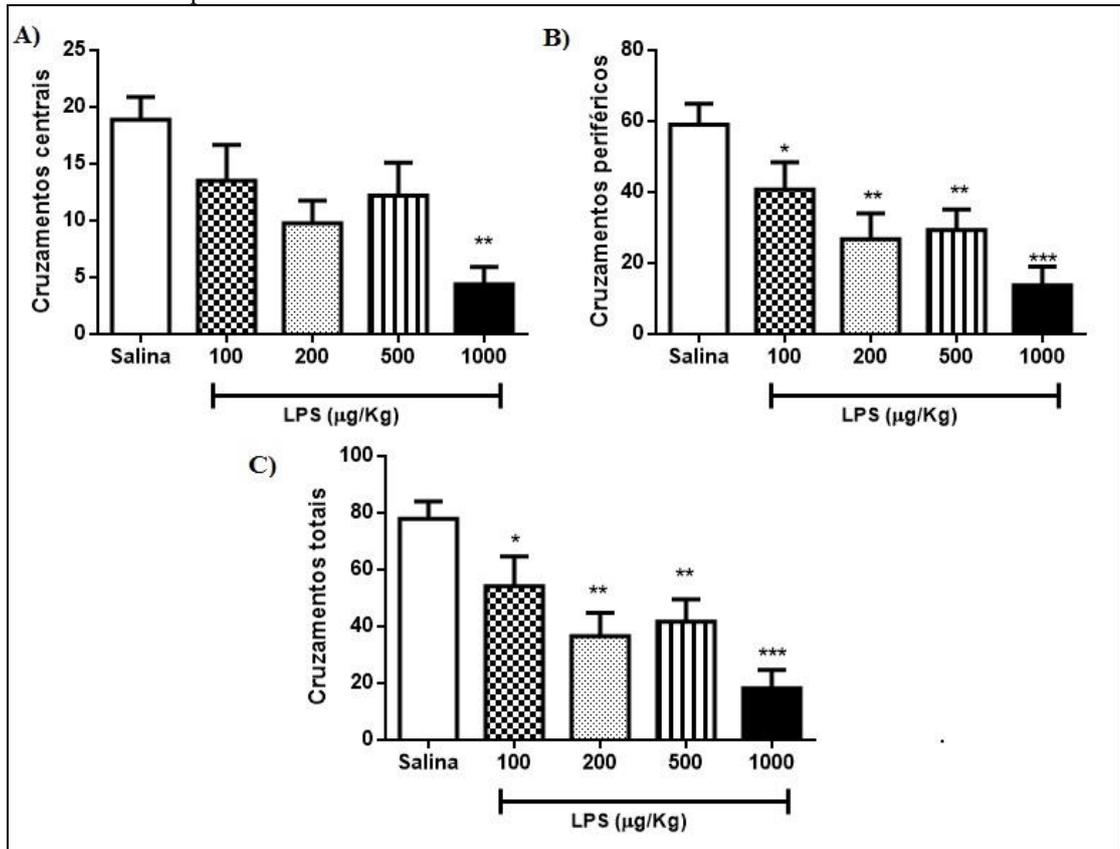


Nota: Número de cruzamentos totais (A), número de cruzamentos periféricos (B) e número total de cruzamentos (C) no teste de campo aberto realizado 2 horas após administração das drogas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  comparados ao grupo salina.

Fonte: Da autora

Já os animais submetidos ao teste após 6 horas do tratamento, quando receberam as doses de 100, 200, 500 e 1000 µg/kg de LPS tiveram redução do número de cruzamentos periféricos ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  respectivamente) e totais ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  respectivamente) quando comparados ao grupo controle (salina). O número de cruzamentos centrais também foi reduzido nos animais tratados com a dose de 1000 µg/kg ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo que recebeu administração de salina, como mostra a figura 10.

Figura 10 – Efeito após 6h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 µg/kg) no Campo Aberto.

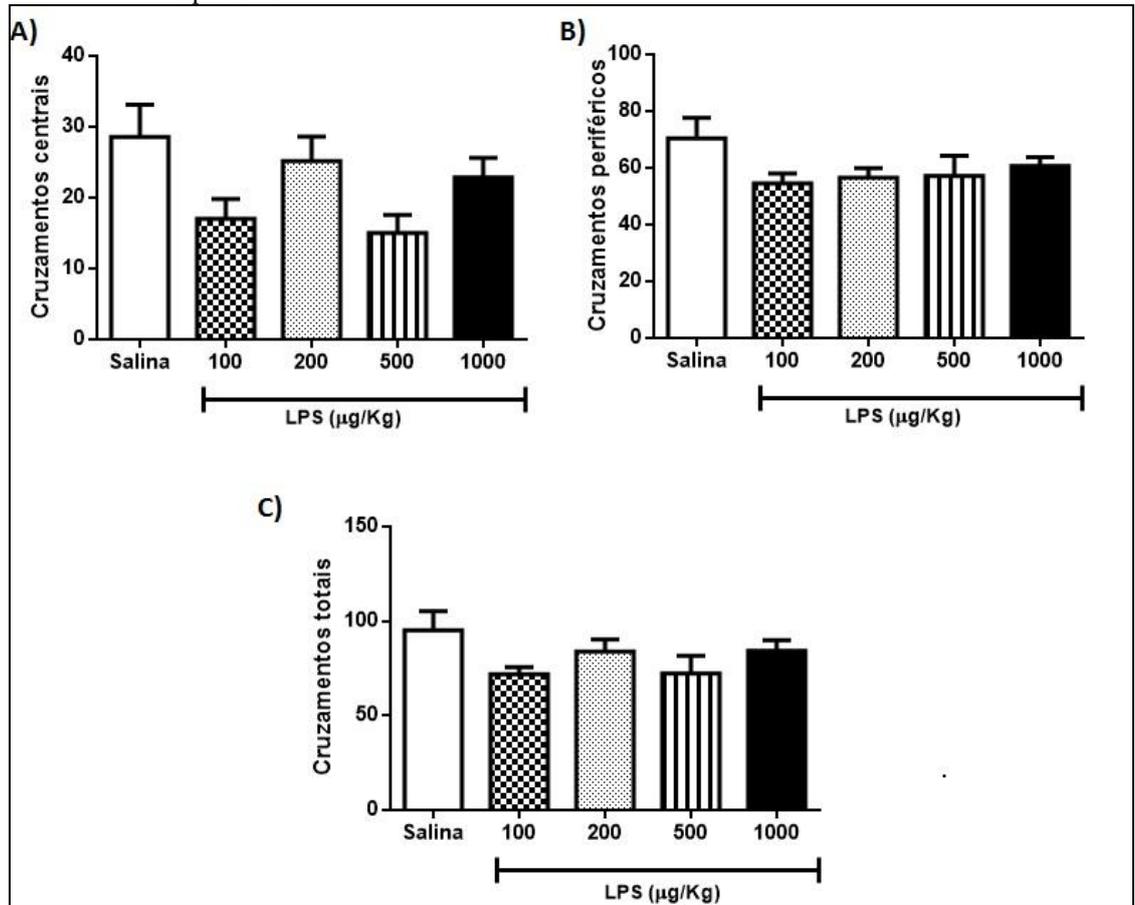


Nota: Número de cruzamentos totais (A), número de cruzamentos periféricos (B) e número total de cruzamentos (C) no teste de Campo Aberto realizado 6 horas após administração das drogas. Dados apresentados como média ± EPM (n= 8-10 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparados ao grupo salina.

Fonte: Da autora.

Por sua vez, quando os animais foram submetidos ao teste 24 horas após a aplicação de LPS ou salina, nenhuma diferença foi observada entre os grupos, como mostra a figura 11.

Figura 11 - Efeito após 24h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no Campo Aberto.



Nota: Número de cruzamentos totais (A), número de cruzamentos periféricos (B) e número total de cruzamentos (C) no teste de campo aberto realizado 24 horas após administração das drogas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8 animais por grupo).

Fonte: Da autora

A tabela 11 apresenta a análise estatística do teste de Campo Aberto feito após os diferentes intervalos de tempo em que foi utilizado o teste de ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newmans Kels.

Tabela 11 – Análise estatística das diferentes doses de LPS no teste de Campo Aberto.

2 horas						
	Salina	100µg/kg	200 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg	F
<b>Central</b>	16,75±1,69	14,14±3,23	7,57±1,02	5,75±1,87	7,89±1,43	F <sub>4,34</sub> = 6,10; p < 0,001
<b>Periférico</b>	62,75±8,61	59,14±11,18	33,86±4,37	25,00±8,66	28,11±5,31	F <sub>4,34</sub> = 5,17; p < 0,01
<b>Total</b>	79,50±9,97	73,28±13,41	41,43±4,67	30,75±27,08	36,0±18,12	F <sub>4,34</sub> = 6,21; p < 0,001
6 horas						
<b>Central</b>	18,89±1,99	13,50±3,17	9,75±2,01	12,20±2,91	4,37±1,54	F <sub>4,40</sub> =4,14; p < 0,01
<b>Periférico</b>	59,0±17,61	40,70±7,76	26,75±7,28	29,40±5,71	13,75±5,29	F <sub>4,40</sub> =6,48; p < 0,001
<b>Total</b>	77,89±6,12	54,20±10,48	36,50±8,25	41,60±7,93	18,13±6,61	F <sub>4,40</sub> =6,92; p < 0,001
24 horas						
<b>Central</b>	26,25±4,57	18,22±2,78	27,25±3,67	17,50±3,35	24,25±2,76	F <sub>4,36</sub> =1,74; p = 0,16
<b>Periférico</b>	32,5±10,14	57,00±3,99	61,38±5,64	60,25±6,90	62,63±3,30	F <sub>4,36</sub> =0,14; p = 0,97
<b>Totais</b>	88,75±10,83	75,33±4,78	88,63±7,36	77,75±9,95	86,88±5,63	F <sub>4,36</sub> =0,67; p = 0,62

Nota: Valores expressos como médias ± EPM.

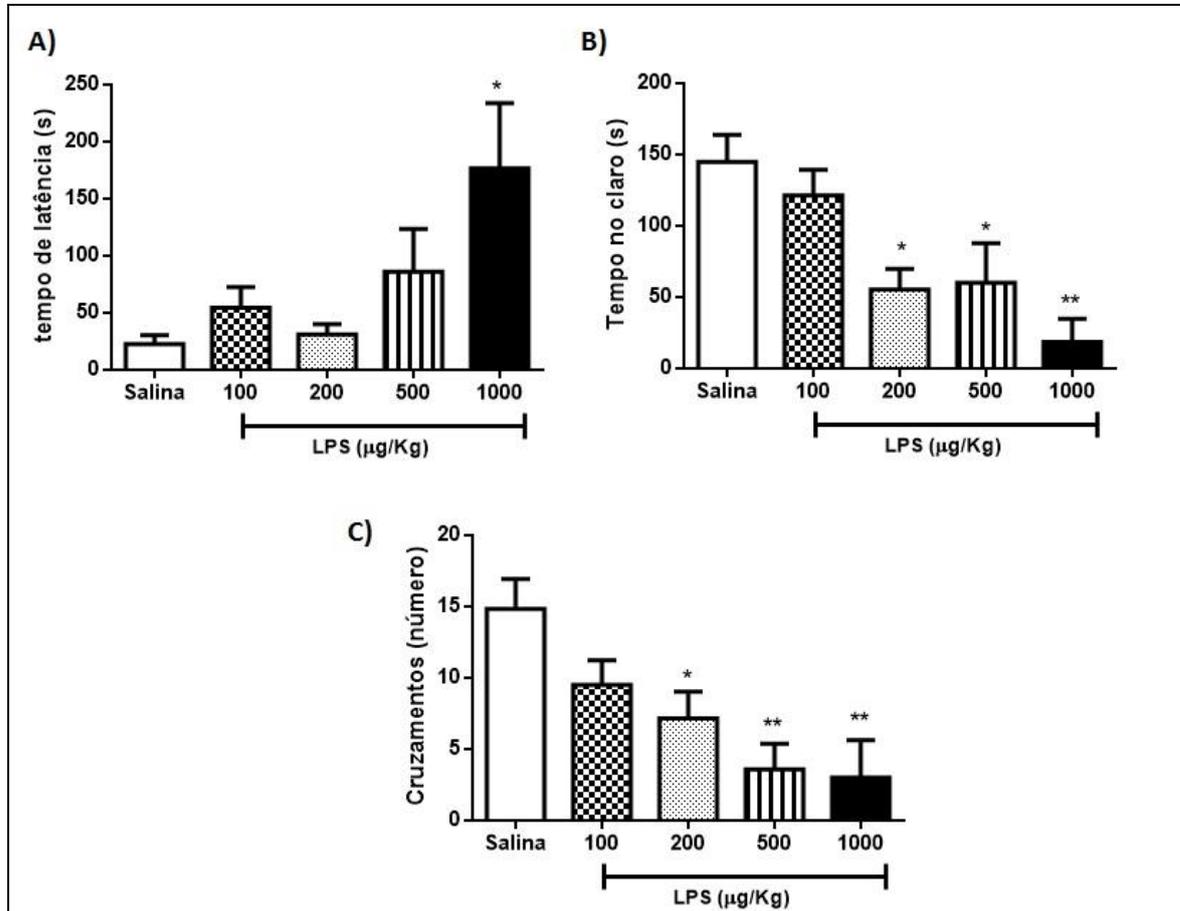
Fonte: Da autora.

### 6.2.1.2 Claro-Escuro

Como mostra a figura 12, quando os camundongos foram expostos ao teste 2 horas após o tratamento, observou-se uma diminuição do tempo que os animais dos grupos tratados com LPS 200, 500 e 1000 µg/kg permaneceram no compartimento claro ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  respectivamente) bem como do número de cruzamento feitos ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  respectivamente) quando comparados ao grupo controle (salina). Houve também o aumento do tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro ( $p < 0,05$ ) dos

animais que receberam LPS na dose de 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  quando comparados aos animais controle, conforme mostrado.

Figura 12 - Efeito após 2h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no Claro-Escuro.

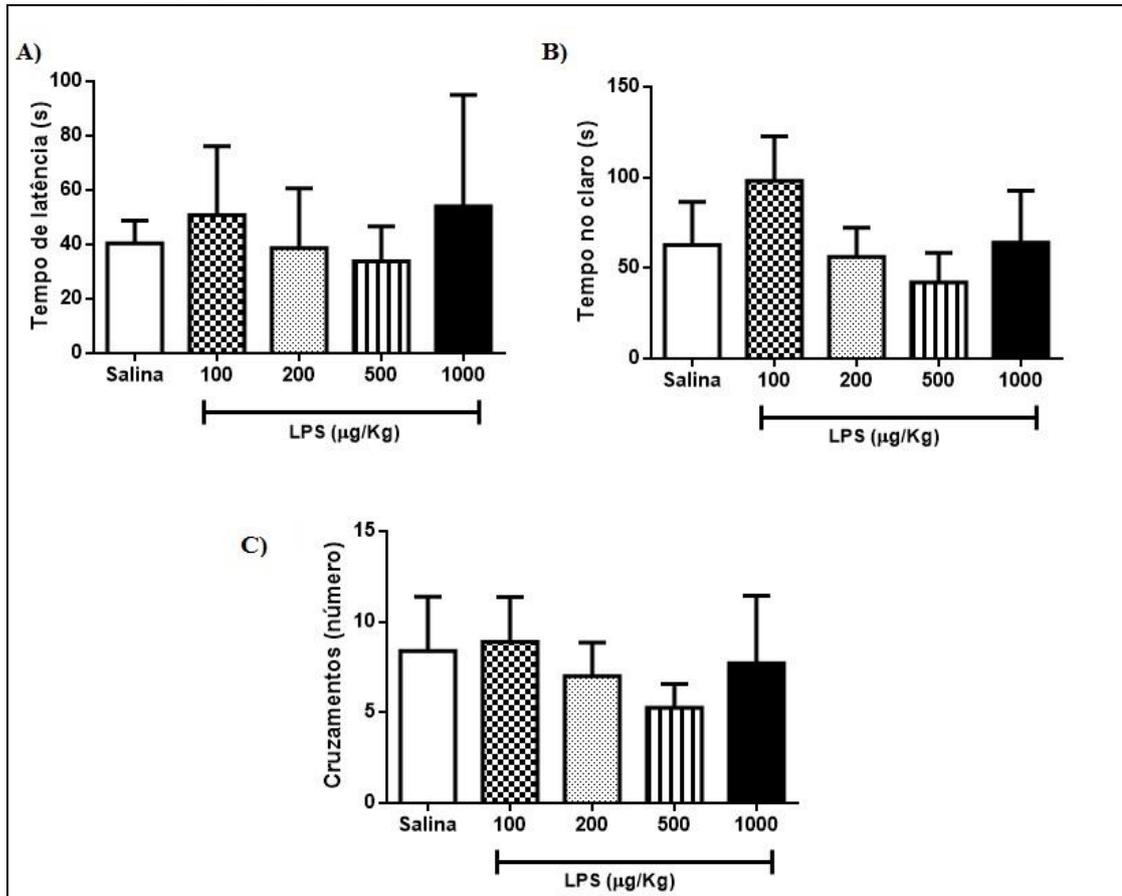


Nota: Tempo de latência para entrada no compartimento escuro (A), tempo total gasto no compartimento claro (B) e número total de cruzamentos entre os compartimentos (C) no teste realizado 2 horas após administração das drogas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 7-8 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparados ao grupo salina.

Fonte: Da autora

Entretanto, nenhuma diferença foi observada nos parâmetros analisados quando os animais foram submetidos ao teste 6 horas após as aplicações, conforme mostra a figura 13 e a análise estatística na tabela 12.

Figura 13 - Efeito após 6h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no Claro-Escuro.

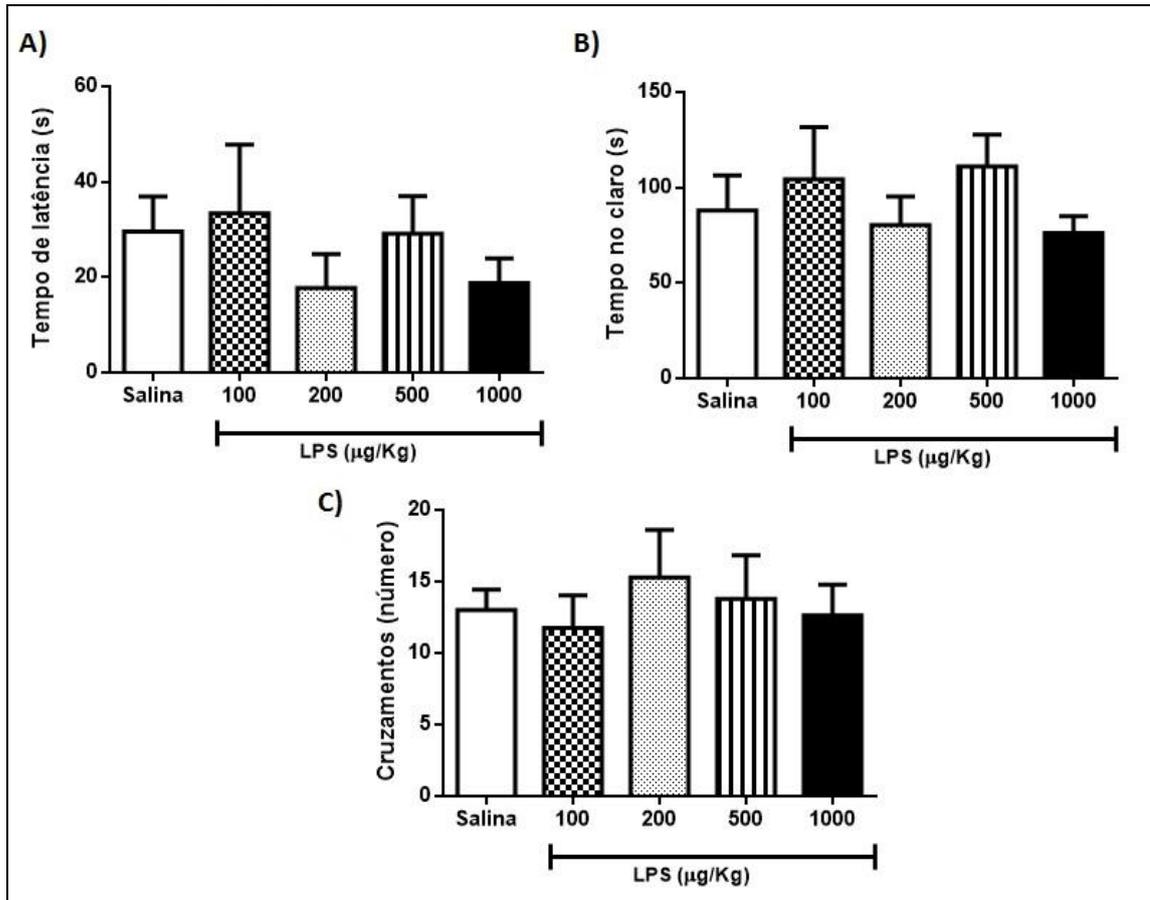


Nota: Tempo de latência para entrada no compartimento escuro (A), tempo total gasto no compartimento claro (B) e número total de cruzamentos entre os compartimentos (C) no teste realizado 6 horas após administração das drogas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 7-9 animais por grupo).

Fonte: Da autora.

Corroborando com os demais resultados, o LPS também não alterou nenhum dos parâmetros estudados no teste de Claro-Escuro quando os animais foram testados após 24 horas da aplicação.

Figura 14 – Efeito após 24h do tratamento (i.p.) com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no Claro-Escuro.



Nota: Tempo de latência para entrada no compartimento escuro (A), tempo gasto no compartimento claro (B) e número total de cruzamentos entre os compartimentos (C) no teste realizado 24 horas após administração das drogas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 7-9 animais por grupo).

Fonte: Da autora.

A análise estatística da tabela 12 apresenta a análise dos resultados do teste de Claro-Escuro nos diferentes tempos de estudo pela ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 12 – Análise estatística das diferentes doses de LPS no teste de Claro-Escuro.

<b>2 horas</b>						
	<b>Salina</b>	<b>100µg/kg</b>	<b>200 µg/kg</b>	<b>500 µg/kg</b>	<b>1000 µg/kg</b>	<b>F</b>
<b>Cruzamentos</b>	14,83±2,09	9,50±1,72	7,17±1,85	3,57±1,81	3,00±2,62	F <sub>4,28</sub> =5,50; p <0,01
<b>Latência</b>	22,67±7,79	54,38±18,25	30,83±9,21	86,00±37,34	176,8±57,1	F <sub>4,28</sub> =3,69; p <0,01
<b>Tempo no claro</b>	144,7±19,01	121,3±18,01	55,33±14,56	60,14±27,61	18,50±16,22	F <sub>4,28</sub> =6,29; p < 0,001
<b>6 horas</b>						
<b>Cruzamentos</b>	8,37±3,02	8,89±2,48	7,00±1,86	5,25±1,32	7,71±3,73	F <sub>4,35</sub> =0,32; p = 0,86
<b>Latência</b>	40,38±8,43	50,78±25,43	38,63±22,08	33,75±12,97	54,00±41,04	F <sub>4,35</sub> =0,13; p = 0,97
<b>Tempo no claro</b>	62,63±23,96	98,11±24,57	56,13±16,20	42,00±16,48	64,00±28,72	F <sub>4,35</sub> =0,92; p =0,46
<b>24 horas</b>						
<b>Cruzamentos</b>	11,38±2,04	11,75±2,30	15,29±3,32	13,78±3,07	12,63±2,15	F <sub>4,35</sub> =0,34; p =0,84
<b>Latência</b>	63,38±34,40	33,38±14,47	17,71±7,13	29,11±7,91	18,75±5,23	F <sub>4,35</sub> =1,09; p =0,37
<b>Tempo no claro</b>	77,00±19,42	104,3±27,38	80,29±14,99	111,1±16,70	76,13±8,79	F <sub>4,35</sub> =0,83; p =0,52

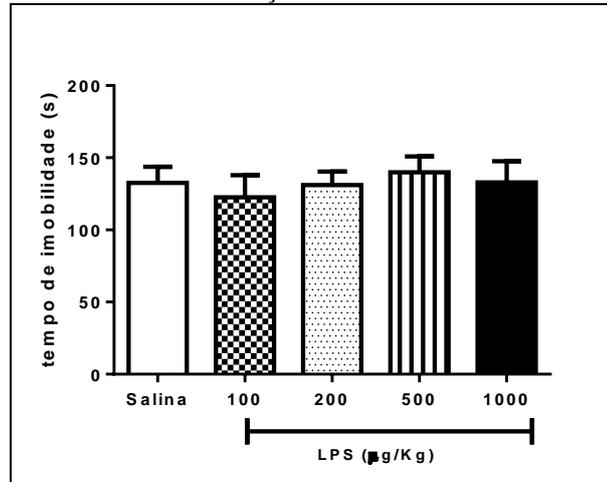
Nota: Valores expressos como média ± EPM.

Fonte: Da autora.

### 6.2.1.3 Nado Forçado

Nenhuma das doses de LPS utilizadas foi capaz de reduzir o tempo total de imobilidade apresentado no teste de nado forçado realizado 2 horas após administração das drogas, como mostra o gráfico 02 e a análise estatística apresentada na tabela 13.

Gráfico 02 - Efeito após 2h do tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p.) no Nado Forçado.

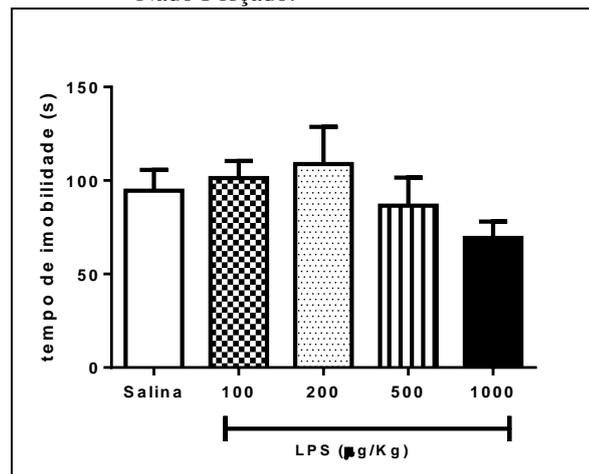


Nota: Tempo de imobilidade após 2 horas da administração das drogas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 7-9 animais por grupo).

Fonte: Da autora.

Os animais submetidos ao teste de Nado Forçado 6 horas após a administração de LPS ou salina também não mostraram diferença no tempo de imobilidade, como mostra o gráfico 03.

Gráfico 03 - Efeito após 6h do tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p.) no Nado Forçado.

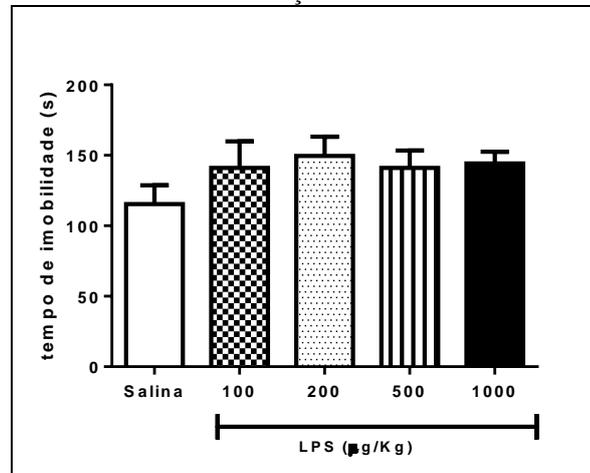


Nota: Tempo de imobilidade após 6 horas da administração das drogas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8 animais por grupo).

Fonte: Da autora.

A ausência de diferenças entre os grupos também é evidenciada nos animais submetidos ao teste 24 horas após os tratamentos, como exposto no gráfico 04 e tabela 13.

Gráfico 04 - Efeito após 24h do tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 µg/kg, i.p.) no Nado Forçado.



Nota: Tempo de imobilidade no teste de nado forçado realizado 24 horas após administração das drogas. Dados apresentados como média ± EPM (n= 8 animais por grupo).

Fonte: Da autora.

A tabela 13 apresenta a análise estatística dos dados do teste de Nado Forçado, feita separadamente em cada tempo de tratamento por meio da ANOVA de uma via e pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 13 – Análise estatística das diversas doses de LPS no teste Nado Forçado.

2 horas						
	Salina	100µg/kg	200 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg	F
<b>Imobilidade</b>	132,5±11,31	122,7±15,25	131,1±9,37	139,9±11,00	132,9±14,76	F <sub>4,34</sub> =0,24; p=0,91
6 horas						
<b>Imobilidade</b>	100,6±11,37	101,3±9,20	100,0±14,32	80,63±14,32	62,25±10,36	F <sub>4,35</sub> =1,66; p=0,18
24 horas						
<b>Imobilidade</b>	115,4±13,30	141,0±18,89	149,6±13,71	141,1±12,26	144,3±8,38	F <sub>4,31</sub> =0,94; p=0,45

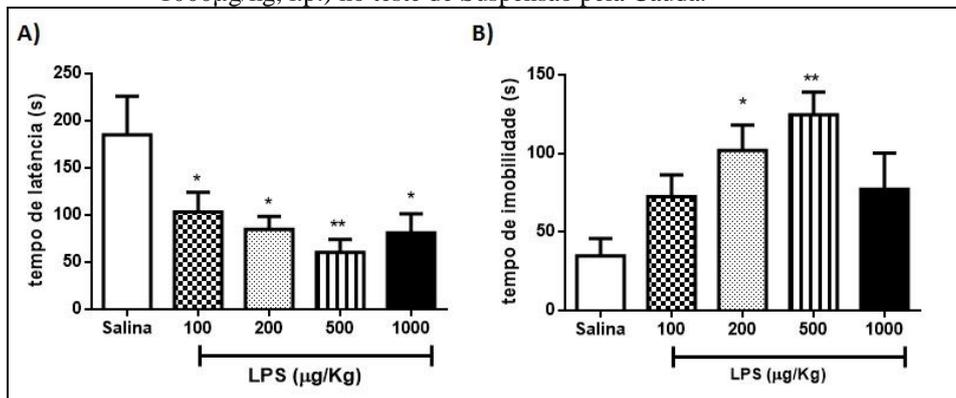
Nota: Valores expressos como média ± EPM.

Fonte: Da autora.

#### 6.2.1.4 Suspensão pela Cauda

O tempo de latência para a manifestação do primeiro evento de imobilidade foi diminuído nos grupos tratados com LPS nas doses de 100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  respectivamente) quando comparados ao grupo controle. Já o tempo que o animal permaneceu imóvel foi aumentado nos grupos que receberam LPS nas doses de 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  respectivamente) quando comparados aos animais tratados com salina quando submetidos ao teste 2 horas após as administrações, como mostra a figura 15.

Figura 15 – Efeito após 2h do tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p.) no teste de Suspensão pela Cauda.

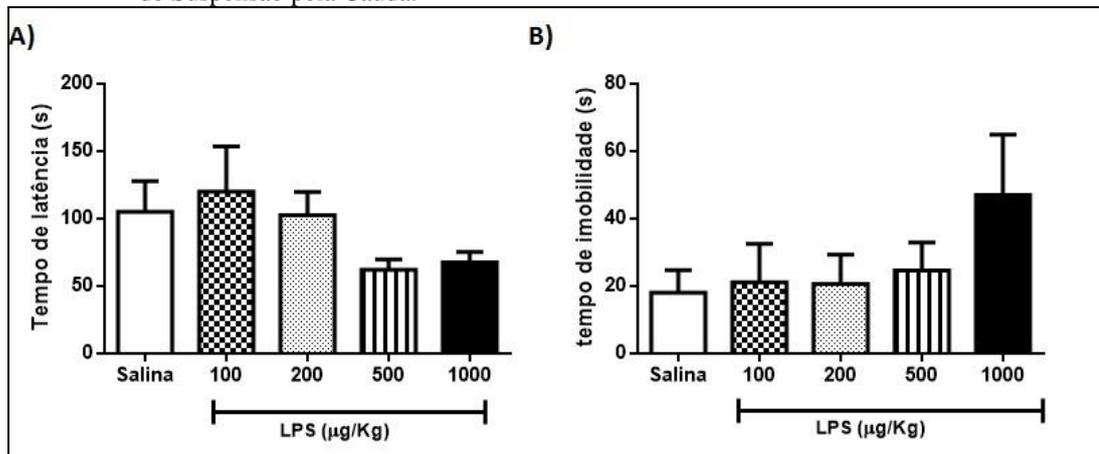


Nota: Tempos de latência (A) e imobilidade (B) no teste realizado 2 horas após administração das drogas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 6-8 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparados ao grupo salina.

Fonte: Da autora.

Já os camundongos submetidos ao teste de Suspensão pela Cauda 6 horas após a administração de salina ou LPS não mostraram nenhuma diferença entre os grupos no tempo de latência para manifestar o primeiro episódio de imobilidade nem no tempo total de imobilidade, como mostra a figura 16, além de exposto na análise estatística na tabela 14.

Figura 16 - Efeito após 6h do tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p.) no teste de Suspensão pela Cauda.

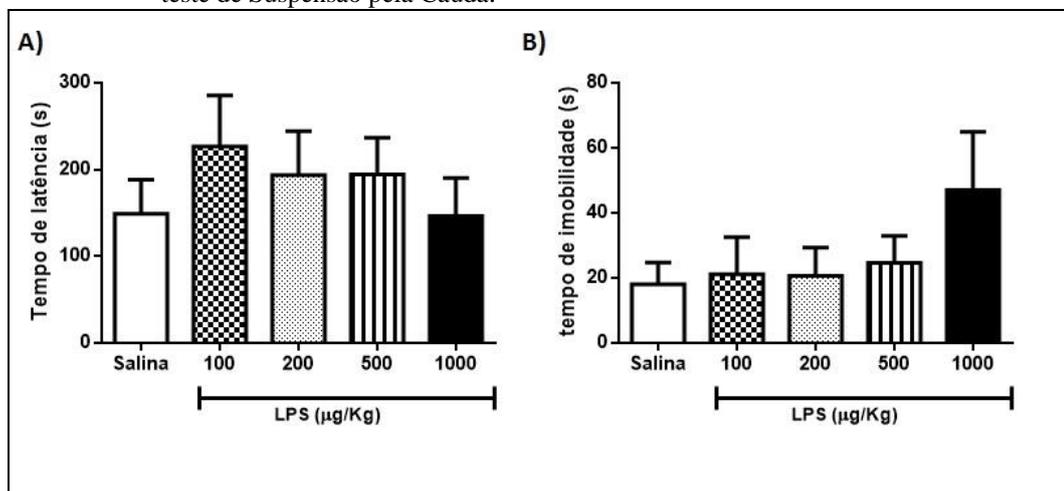


Nota: Tempos de latência (A) e imobilidade (B) no teste realizado 6 horas após administração das drogas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 7-9 animais por grupo).

Fonte: Da autora.

A semelhança de comportamento entre os grupos estudados também foi evidenciada nos animais submetidos ao teste 24 horas após os tratamentos, como exposto na figura 17.

Figura 17 – Efeito 24h após tratamento com salina ou LPS (100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p.) no teste de Suspensão pela Cauda.



Nota: Tempos de latência (A) e imobilidade (B) no teste realizado 24 horas após administração das drogas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 7-8 animais por grupo).

Fonte: Da autora.

A análise estatística do teste de Suspensão pela Cauda nos diferentes tempos é apresentada na Tabela 14, em que usou-se o teste de ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 14 – Análise estatística das diversas doses de LPS no teste de Suspensão pela Cauda.

2 horas						
	Salina	100µg/kg	200 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg	F
<b>Imobilidade</b>	42,14±11,81	72,38±13,90	91,17±16,92	124,5±40,68	77,20±22,93	F <sub>4,29</sub> = 4,12; p < 0,01
<b>Latência</b>	171,0±37,22	103,1±21,23	71,83±3,58	60,50±13,69	81,00±20,30	F <sub>4,29</sub> = 3,84; p < 0,05
6 horas						
<b>Imobilidade</b>	63,89±12,55	55,88±19,66	74,38±14,24	88,14±19,35	99,44±19,27	F <sub>4,36</sub> = 1,09; p=0,37
<b>Latência</b>	80,89±13,76	120,0±33,54	115,8±19,97	62,00±7,98	75,22±10,29	F <sub>4,36</sub> = 1,70; p=0,17
24 horas						
<b>Imobilidade</b>	29,14±12,52	21,14±11,34	20,63±8,66	24,63±8,32	47,00±17,95	F <sub>4,32</sub> = 0,34; p=0,85
<b>Latência</b>	179,1±44,92	226,6±58,81	193,5±50,78	194,4±42,16	146,3±44,0	F <sub>4,32</sub> = 0,34; p=0,85

Nota: Valore expressos como média ± EPM.

Fonte: Da autora.

Tendo em vista os resultados obtidos nos testes de Campo Aberto, Claro-Escuro, Nado Forçado e Suspensão pela Cauda, foi definida a dose de 200 µg/kg e o tempo de 2h como o mais adequado para o estudo das alterações comportamentais típicas do comportamento doentio desencadeadas pela endotoxemia bem como do envolvimento dos receptores TRPV1 nessas modificações.

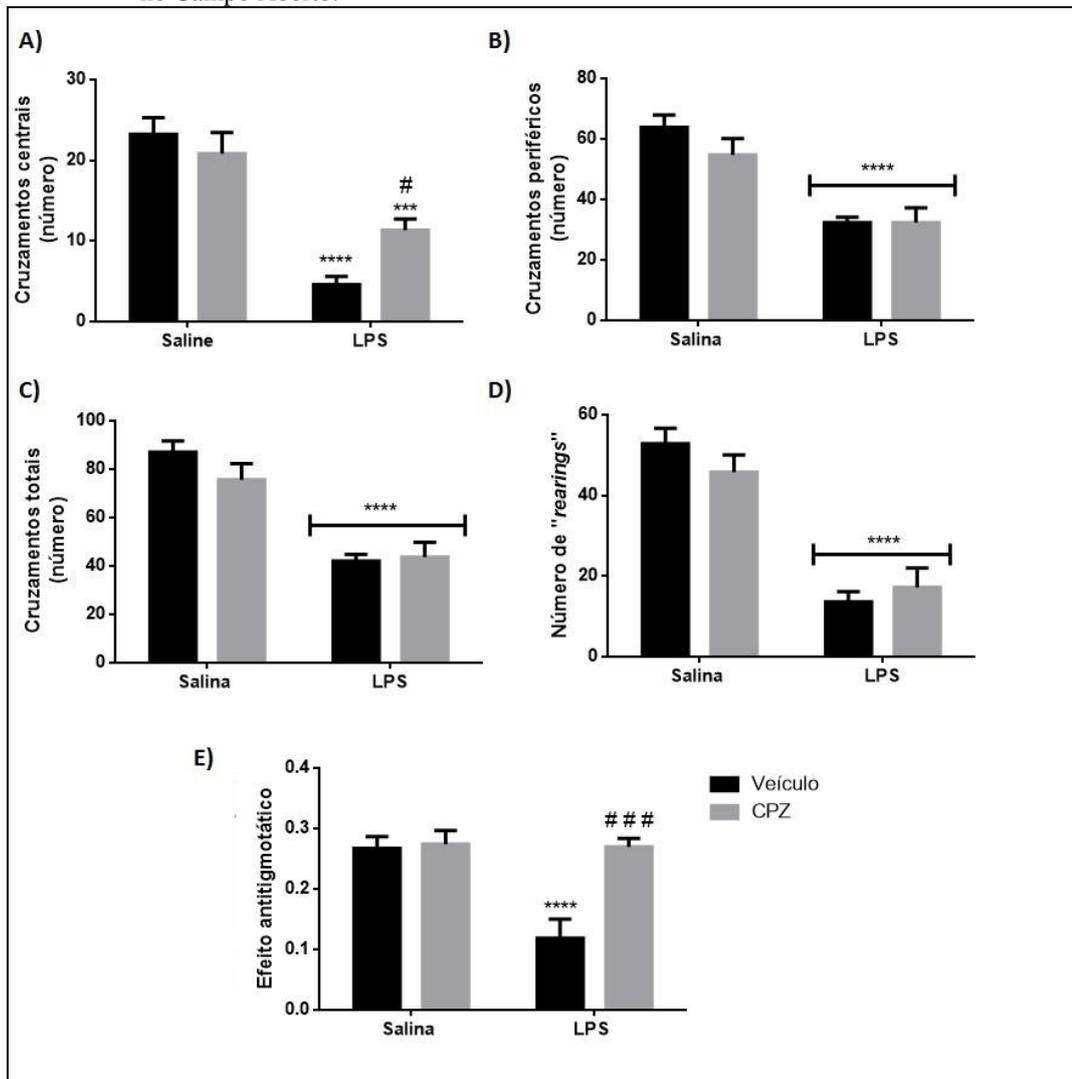
### 6.2.2 Efeito do pré-tratamento com CPZ no comportamento doentio

A seguir estão apresentados os resultados obtidos nos estudos para avaliação do efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor TRPV1 no comportamento doentio.

### 6.2.2.1 Campo Aberto

Como mostra a figura 18, a administração da endotoxina tanto nos grupos pré-tratados com veículo quanto com CPZ, promoveu diminuição dos cruzamentos centrais ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,001$  respectivamente) além dos periféricos, totais e números de *rearing* ( $p < 0,0001$  em ambos os grupos) quando comparados ao grupo controle (veículo+salina). Além disso o LPS diminuiu ( $p < 0,0001$ ) o efeito antitigmotático nos animais pré-tratados com veículo comparados ao grupo controle, sendo que o bloqueio do receptor TRPV1 foi capaz de aumentar tal efeito ( $p < 0,001$ ) e ainda o número de cruzamentos centrais ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados com LPS quando comparados aos pré-tratados com veículo.

Figura 18 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ em animais tratados com salina ou LPS no Campo Aberto.

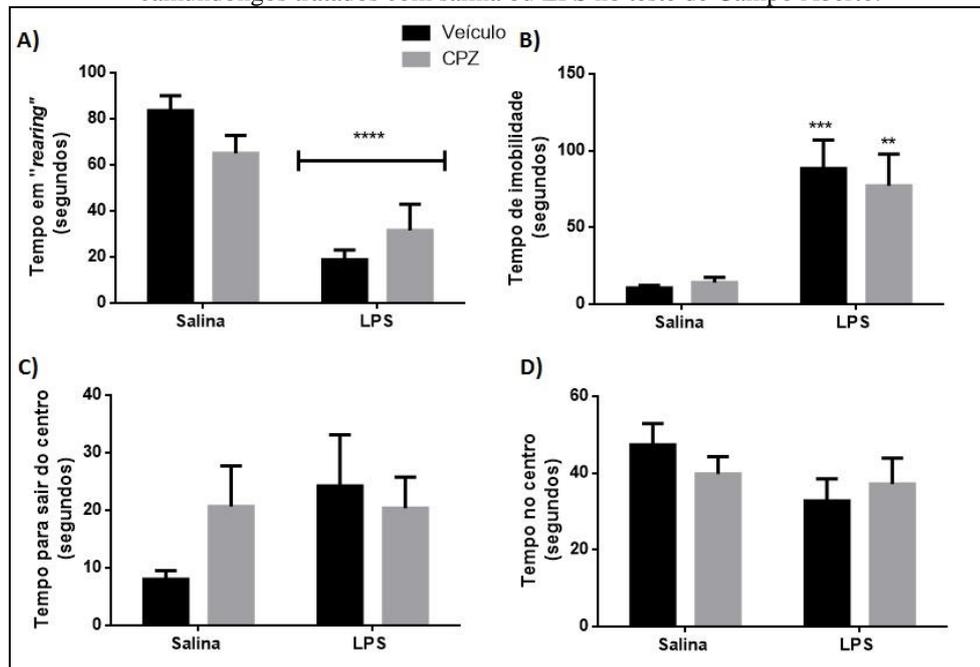


Nota: Número de cruzamentos centrais (A), periféricos (B), totais (C), de *rearings* (D) e efeito antitigmotático. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 11-13 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo veículo+salina; #  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo + LPS.

Fonte: Da autora

Ainda no teste de Campo Aberto, não foram observadas alterações entre os grupos no tempo gasto pelo animal para sair dos quadrantes centrais e no gasto no centro do aparato, entretanto o tempo que o animal permaneceu em *rearing*, ou seja, em exploração vertical foi significativamente diminuído ( $p < 0,0001$ ) nos animais tratados com LPS quando comparados aos animais controle (grupo salina+veículo). O tempo de imobilidade, por sua vez, foi aumentado nos animais tratados com LPS de maneira independente do pré-tratamento ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$  para veículo e CPZ respectivamente), como exposto na figura 19. Portanto, nota-se que o bloqueio dos receptores TRPV1 não promoveu alterações dos parâmetros relacionados a tempo (*rearing*, gasto no centro, de imobilidade e para sair do centro).

Figura 19 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ em análises temporais de camundongos tratados com salina ou LPS no teste de Campo Aberto.



Nota: Tempos: em *rearing* (A), de imobilidade (B), para sair do centro (C), no centro do aparato (D). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 11-13 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo veículo+salina.

Fonte: Da autora.

A tabela 15 mostra a análise estatística do teste de Campo Aberto que foi feita por meio de ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls, em que o pré-tratamento é representado pela administração de veículo ou CPZ e a aplicação de salina ou LPS correspondem à variável denominada tratamento.

Tabela 15 - Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos ao teste de Campo Aberto.

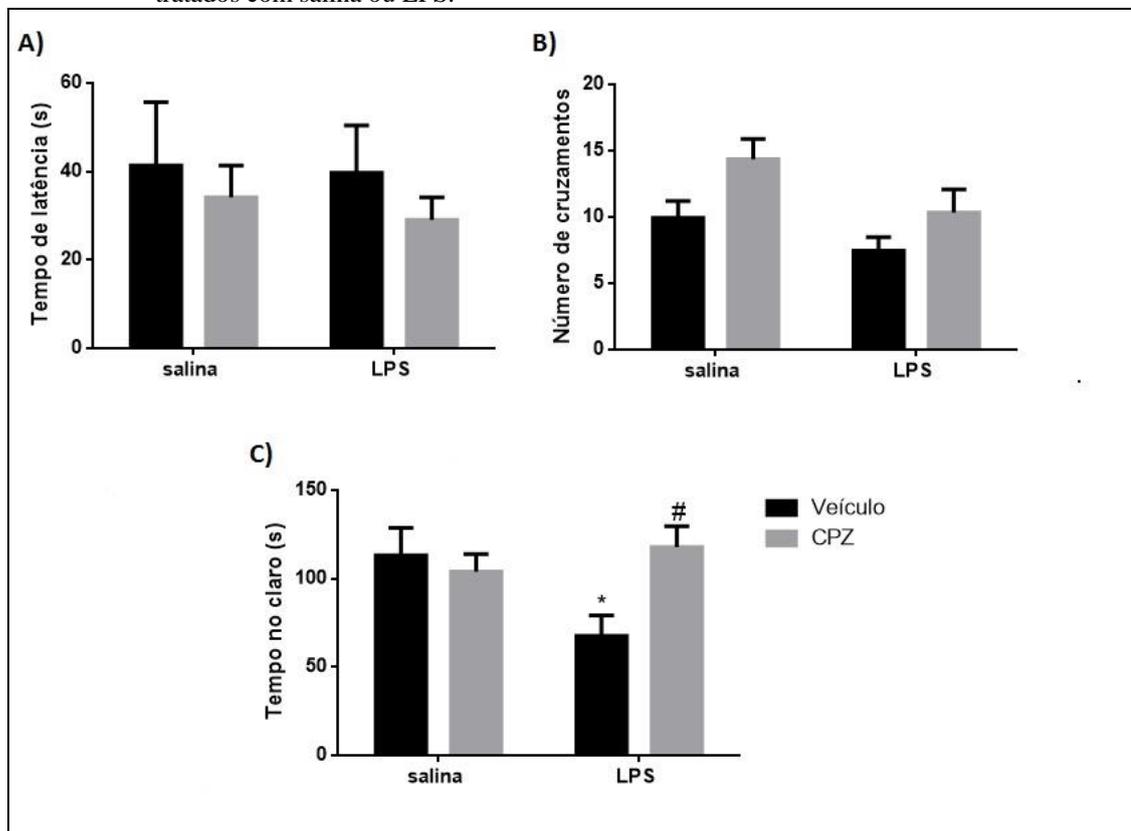
	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
<b>C. Centrais</b>	$F_{1,40}=1,137; p = 0,29$	$F_{1,40} = 47,87; p < 0,0001$	$F_{1,40}=5,044; p < 0,05$
<b>C. Periféricos</b>	$F_{1,40}=1,054; p = 0,31$	$F_{1,40} = 37,38; p < 0,0001$	$F_{1,40} = 1,07; p = 0,31$
<b>C. Totais</b>	$F_{1,40}=0,80; p = 0,38$	$F_{1,40} = 49,98; p < 0,001$	$F_{1,40} = 1,45; p = 0,24$
<b>Rearing</b>	$F_{1,40}=0,19; p = 0,67$	$F_{1,40}=71,95; p < 0,0001$	$F_{1,40} = 1,80; p = 0,19$
<b>Ef. Antitigmot.</b>	$F_{1,40}=11,63; p < 0,01$	$F_{1,40}=10,83; p < 0,01$	$F_{1,40}=9,59; p < 0,01$
<b>T. rearing</b>	$F_{1,40}=0,14; p = 0,71$	$F_{1,40}=41,01; p < 0,0001$	$F_{1,40}=4,17; p < 0,05$
<b>T. imobilidade</b>	$F_{1,40}=0,10; p = 0,75$	$F_{1,40}=33,68; p < 0,0001$	$F_{1,40}=0,38; p = 0,54$
<b>T. sair do centro</b>	$F_{1,40}=0,51; p = 0,48$	$F_{1,40}=1,67; p = 0,20$	$F_{1,40}=1,82; p = 0,19$
<b>T. no centro</b>	$F_{1,40}=0,08; p = 0,78$	$F_{1,40}=2,29; p = 0,14$	$F_{1,40}=1,10; p = 0,30$

Fonte: Da autora

## 6.2.2.2 Claro-Escuro

De acordo com o apresentado na figura 20, o tempo de permanência no compartimento claro, aversivo a roedores, foi diminuído ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados com LPS após pré-tratamento com veículo quando comparados ao grupo controle (veículo+salina). Entretanto, o bloqueio dos receptores TRPV1, com pré-tratamento com CPZ, foi capaz de reverter a diminuição do tempo de permanência no compartimento claro dos animais que receberam endotoxina ( $p < 0,05$ ).

Figura 20 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ no Claro-Escuro feito em camundongos tratados com salina ou LPS.



Nota: Tempo de latência para entrada no compartimento escuro (A), número de cruzamentos entre os compartimentos (B) e tempo de permanência no compartimento claro (C). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 11-13$  animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , comparados ao grupo veículo+salina e #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + LPS.

Fonte: Da autora

A análise estatística foi feita por meio de ANOVA de duas vias com pós-teste de Newman-Keuls. A administração de veículo ou CPZ representa a variável pré-tratamento, enquanto a aplicação de salina ou LPS correspondem à variável tratamento.

Tabela 16 - Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos ao teste de Claro-Escuro.

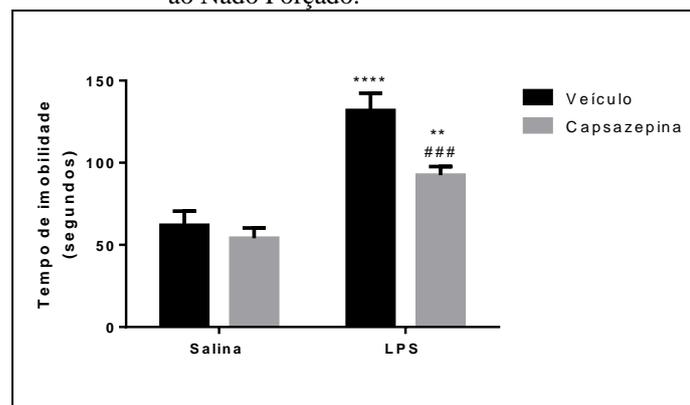
	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
<b>Latência</b>	$F_{1,42}=0,78; p=0,38$	$F_{1,42}=0,11; p=0,74$	$F_{1,42}=0,03; p=0,86$
<b>Cruzamentos</b>	$F_{1,42}=6,54; p=0,03$	$F_{1,42}=5,14; p=0,03$	$F_{1,42}=0,30; p=0,59$
<b>T. no claro</b>	$F_{1,42}=2,66; p=0,11$	$F_{1,42}=1,59; p=0,21$	$F_{1,42}=5,56; p<0,05$

Fonte: Da autora

### 6.2.2.3 Nado Forçado

O LPS, administrado em conjunto com o veículo promoveu o aumento ( $p < 0,0001$ ) do tempo que o animal permaneceu imóvel no teste de Nado forçado quando comparado ao grupo que recebeu administração de salina e veículo, como é possível observar no gráfico 05 e a capsazepina por sua vez, ao comparar os animais tratados com endotoxina, foi capaz de diminuir tal aumento de imobilidade ( $p < 0,001$ ).

Gráfico 05 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ nos animais tratados com salina ou LPS submetidos ao Nado Forçado.



Nota: Tempo de imobilidade. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 13 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\* $p<0,01$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ , comparados ao grupo veículo+salina; ### $p<0,001$  quando comparado ao grupo veículo+LPS.

Fonte: Da autora

A da análise estatística feita por meio da ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls é apresentada na tabela 17 e a variável pré-tratamento é dada pela

administração de veículo e CPZ, enquanto a aplicação de salina ou LPS determinam a variável tratamento.

Tabela 17 – Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos ao teste de Nado Forçado.

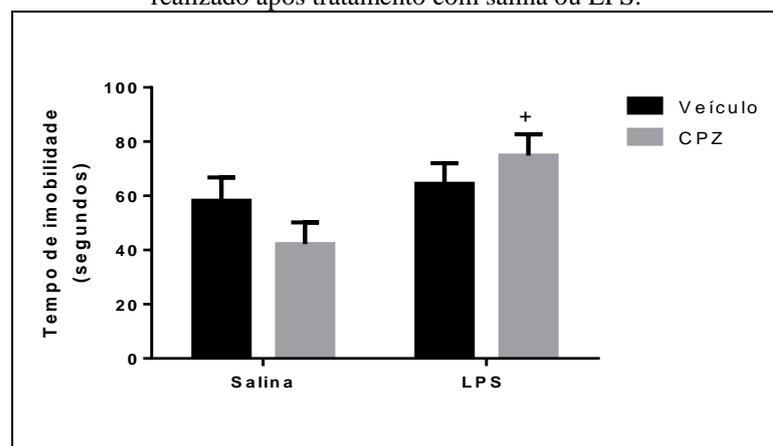
	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
<b>T. imobilidade</b>	$F_{1,46} = 9,22; p < 0,01$	$F_{1,46} = 48,51; p < 0,0001$	$F_{1,46} = 4,11; p < 0,05$

Fonte: Da autora

#### 6.2.2.4 Suspensão pela Cauda

O teste de Suspensão pela Cauda analisa também o tempo que o animal permanece imóvel quando suspenso. O gráfico 06 mostra que apenas o grupo pré-tratado com CPZ e tratado com LPS aumentou ( $p < 0,05$ ) o tempo de imobilidade quando comparado aos animais tratados com o bloqueador do receptor e salina. Nos demais grupos não foi observada nenhuma alteração, conforme mostra análise estatística apresentada na tabela 18.

Gráfico 06 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ no tempo de imobilidade do animal no teste de Suspensão pela Cauda realizado após tratamento com salina ou LPS.



Nota: Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 11-12 animais por grupo). O símbolo representa o nível de significância: +  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo CPZ+salina.

Fonte: Da autora

A análise estatística feita por meio da ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls é apresentada a seguir na tabela 18, na qual a variável pré-tratamento é dada

pela aplicação de veículo ou CPZ e a variável tratamento pela administração de salina ou LPS.

Tabela 18 - Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos ao teste de Suspensão pela Cauda.

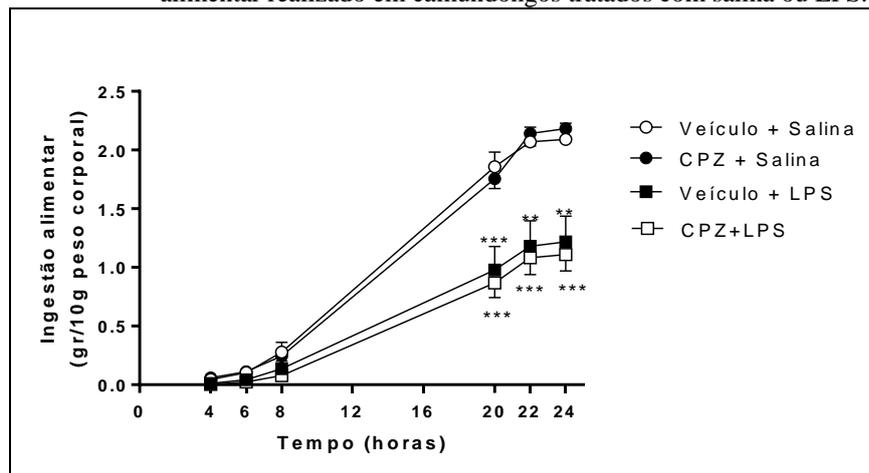
	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
<b>Imobilidade</b>	$F_{1,39} = 0,12; p = 0,73$	$F_{1,39} = 5,94; p < 0,05$	$F_{1,39} = 2,74; p = 0,11$

Fonte: Da autora.

### 6.2.2.5 Ingestão alimentar e ganho de peso

Como é possível observar no gráfico 07, a endotoxina causou redução na ingestão de alimentos nos animais tratados com veículo e CPZ após 20 (\*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  respectivamente), 22 (\*\*  $p < 0,01$  em ambos os grupos) e 24 horas (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  respectivamente) da administração de LPS quando comparados aos animais que receberam pré-tratamento com veículo e tratamento com salina. Sendo portanto a CPZ incapaz de promover alteração na ingestão alimentar dos camundongos.

Gráfico 07 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ no teste de ingestão alimentar realizado em camundongos tratados com salina ou LPS.

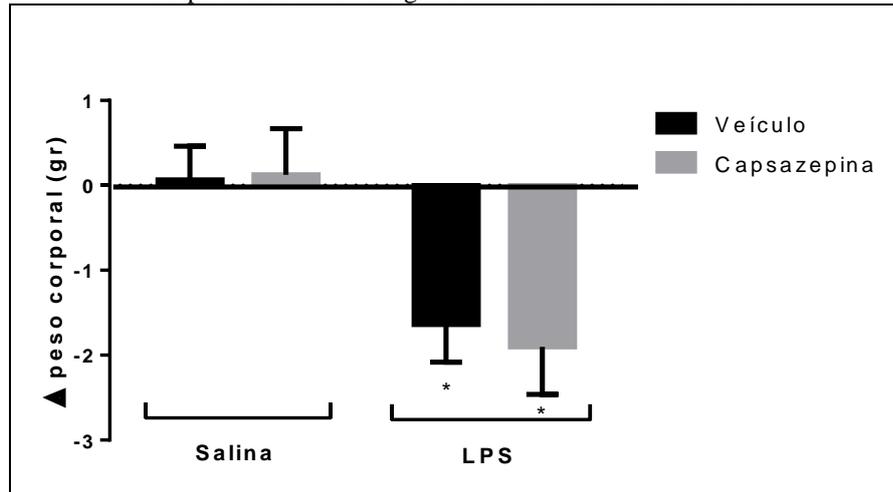


Nota: Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 9-10 animais por grupo). Os símbolos representam o nível de significância: \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparação feita no mesmo horário com grupo veículo+salina.

Fonte: Da autora

O gráfico 08, por sua vez, mostra a variação de peso dos animais, no qual nota-se a perda de peso dos animais que receberam LPS e ganho dos tratados com salina. Houve a redução de peso nos animais tratados com LPS e pré-tratados tanto com veículo quanto com capsazepina ( $*p < 0,05$  em ambos) quando comparados aos animais do grupo veículo+salina.

Gráfico 08 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ na variação de peso corporal dos camundongos tratados com salina ou LPS.



Nota: Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 9-10 animais por grupo). O símbolo \* representa o nível de significância:  $*p < 0,05$  quando comparados ao grupo veículo+salina.

Fonte: Da autora.

Na tabela 19 está exposta a análise estatística feita por meio do teste de ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Newman-Keuls, em que administração de veículo ou CPZ e salina ou LPS representam as variáveis pré-tratamento e tratamento respectivamente.

Tabela 19 - Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos ao teste de ingestão alimentar.

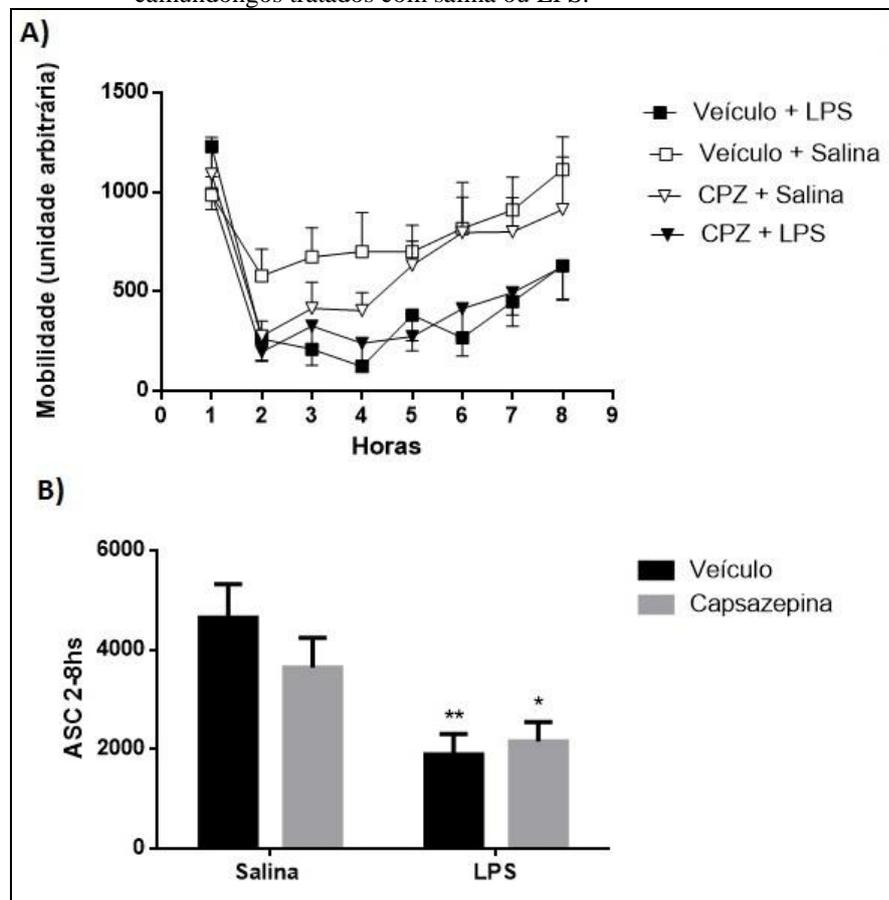
	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
<b>4 horas</b>	$F_{1,32} = 0,01; p = 0,92$	$F_{1,32} = 4,81; p < 0,05$	$F_{1,32} = 0,31; p = 0,58$
<b>6 horas</b>	$F_{1,32} = 0,02; p = 0,90$	$F_{1,32} = 3,36; p = 0,08$	$F_{1,32} = 0,09; p = 0,76$
<b>8 horas</b>	$F_{1,32} = 0,37; p = 0,55$	$F_{1,32} = 4,14; p = 0,05$	$F_{1,32} = 0,03; p = 0,86$
<b>20 horas</b>	$F_{1,32} = 0,52; p = 0,48$	$F_{1,32} = 35,69; p < 0,0001$	$F_{1,32} = 0,0004; p = 0,98$
<b>22 horas</b>	$F_{1,32} = 0,008; p = 0,93$	$F_{1,32} = 36,28; p < 0,0001$	$F_{1,32} = 0,027; p = 0,61$
<b>24 horas</b>	$F_{1,32} = 0,002; p = 0,96$	$F_{1,32} = 36,00; p < 0,0001$	$F_{1,32} = 0,39; p = 0,54$
<b>Peso animal</b>	$F_{1,32} = 0,04; p = 0,84$	$F_{1,32} = 14,64; p < 0,001$	$F_{1,32} = 0,11; p = 0,75$

Fonte: Da autora.

### 6.2.2.6 Telemetria - análise da mobilidade e temperatura corpórea

A figura 21 mostra que, a exemplo da análise de atividade locomotora avaliada pelo Campo Aberto (fig. 18), o LPS diminui ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) a mobilidade dos animais independente do pré-tratamento (veículo ou capsazepina), sendo portanto o bloqueio do receptor TRPV1 incapaz de promover qualquer alteração no parâmetro.

Figura 21 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ na mobilidade de camundongos tratados com salina ou LPS.



Nota: Apresentação de forma temporal (A) e área sob a curva (B). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 12 animais por grupo). Os símbolos representam o nível de significância: \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo veículo+salina.

Fonte: Da autora

A análise estatística é apresentada na tabela 20 de forma detalhada feita separadamente a cada hora de avaliação por meio do teste de ANOVA de duas vias e pós-teste de Newman-Keuls.

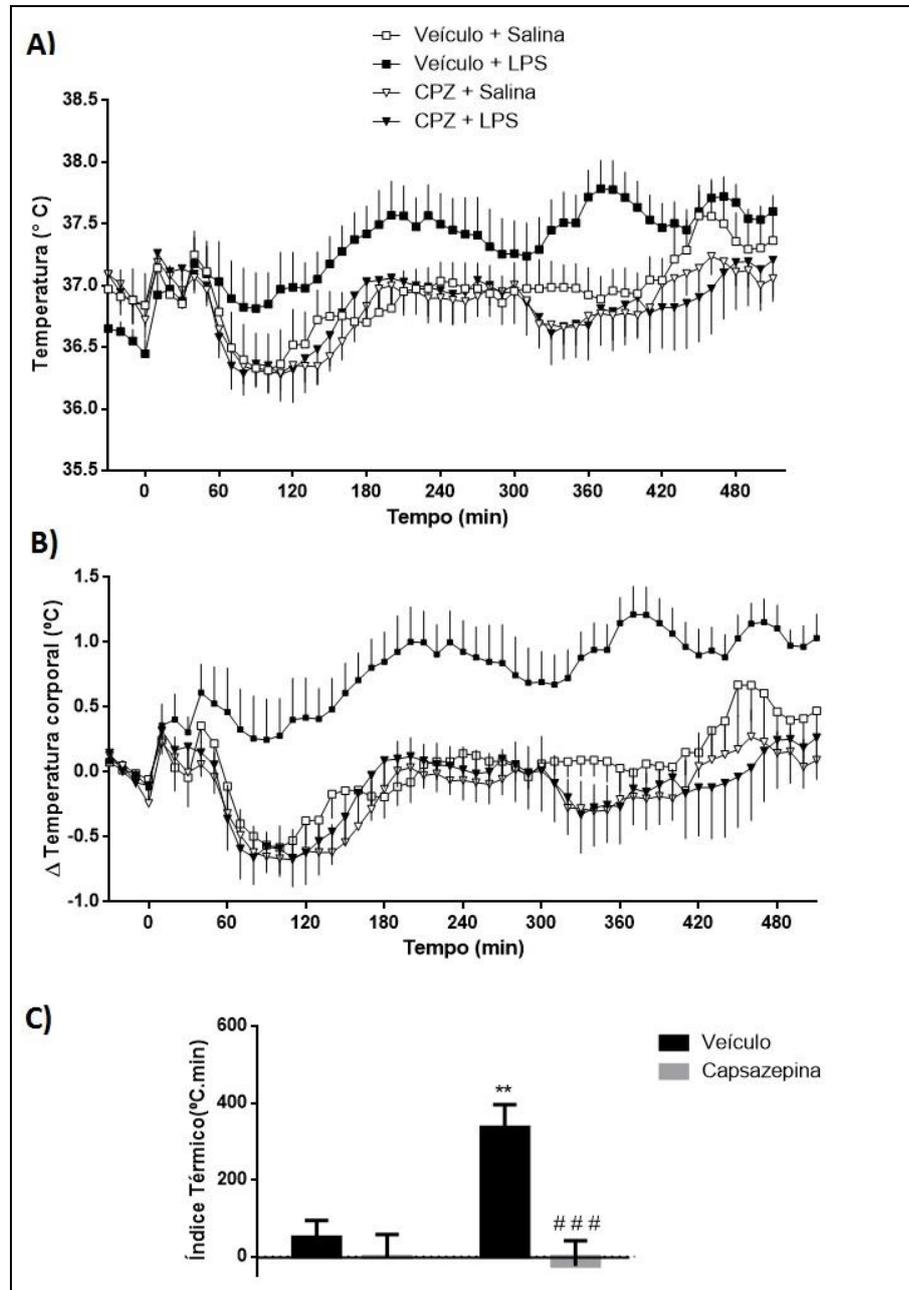
Tabela 20 - Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos à avaliação de mobilidade.

	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
<b>1 hora</b>	$F_{1,42}=0,20; p = 0,65$	$F_{1,42} = 0,23; p=0,63$	$F_{1,42}=1,27; p = 0,27$
<b>2 horas</b>	$F_{1,42}=3,56; p = 0,06$	$F_{1,42}=4,13; p = 0,05$	$F_{1,42}=1,48; p = 0,23$
<b>3 horas</b>	$F_{1,42}=0,34; p = 0,56$	$F_{1,42}=5,24; p < 0,05$	$F_{1,42}=2,42; p = 0,13$
<b>4 horas</b>	$F_{1,42}=1,81; p = 0,18$	$F_{1,42}=0,006; p = 0,94$	$F_{1,42}=0,19; p = 0,67$
<b>5 horas</b>	$F_{1,42}=0,56; p = 0,46$	$F_{1,42} = 8,47; p < 0,01$	$F_{1,42}=0,029; p = 0,87$
<b>6 horas</b>	$F_{1,42}=0,12; p = 0,73$	$F_{1,42} = 6,89; p < 0,05$	$F_{1,32}=0,22; p = 0,64$
<b>7 horas</b>	$F_{1,42}=0,05; p = 0,83$	$F_{1,42} = 6,60; p < 0,05$	$F_{1,32}=0,27; p = 0,61$
<b>8 horas</b>	$F_{1,42}=0,27; p = 0,61$	$F_{1,42}=3,78; p = 0,06$	$F_{1,42}=0,24; p = 0,62$
<b>ASC</b>	$F_{1,42}=0,46; p = 0,50$	$F_{1,42}=14,97; p < 0,001$	$F_{1,42}=1,35; p = 0,25$

Fonte: Da autora

Em relação à análise da temperatura corpórea, a figura 22 mostra que os animais tratados com LPS e pré-tratados com salina tiveram a temperatura corporal aumentada ( $p < 0,01$ ) e a o pré-tratamento com capsazepina foi capaz de diminuir ( $p < 0,001$ ) tal aumento promovido pela endotoxina.

Figura 22 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ e tratamento com salina ou LPS na temperatura corpórea de camundongos.



Nota: Temperatura corporal (A), variação da temperatura corporal (B) e índice térmico calculado entre 150 e 510 minutos (C). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 12 animais por grupo). Os símbolos representam o nível de significância: \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo veículo+salina e ### $p < 0,001$  quando comparado ao grupo veículo + LPS.

Fonte: Da autora

Na tabela 21 é apresentada a análise estatística do índice térmico feita pela ANOVA de duas vias em que a variável pré-tratamento representa a administração de veículo ou CPZ e a variável tratamento a aplicação de salina ou LPS.

Tabela 21 - Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS submetidos à avaliação da temperatura corporal.

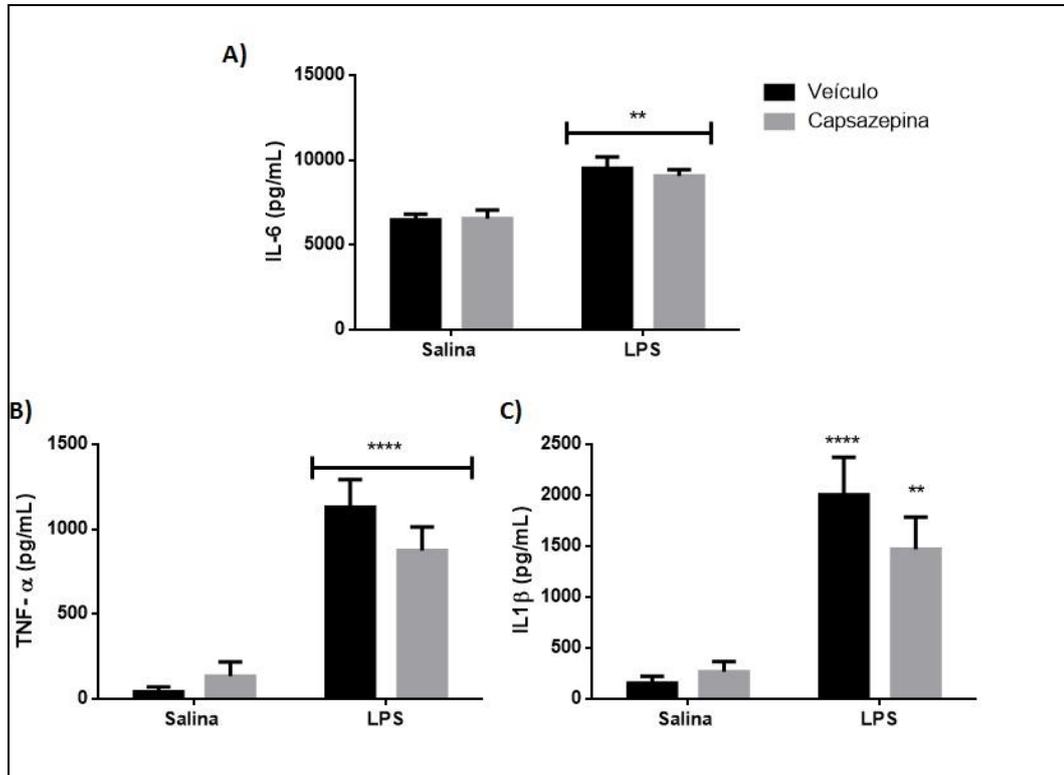
	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
<b>Índice Térmico (150-510')</b>	$F_{1,42}=12,69; p < 0,001$	$F_{1,42}=5,16; p < 0,05$	$F_{1,42}=7,10; p < 0,05$

Fonte: Da autora

#### 6.2.2.7 Análise das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$

Os animais que receberam administração de LPS tiveram os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  acentuados, sendo que a concentração plasmática de IL-6 e TNF- $\alpha$  mostrou-se aumentada ( $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$  respectivamente) independente do pré-tratamento recebido, quando comparados aos animais tratados com veículo + salina, conforme é possível observar na figura 23. Já o nível de IL-1 $\beta$ , por sua vez, mostrou-se aumentado ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$  respectivamente) nos grupos veículo+LPS e capsazepina+LPS quando comparados aos animais que receberam pré-tratamento de veículo e tratamento com salina. Como é possível constatar, o bloqueio dos receptores TRPV1 não foi capaz de promover nenhuma alteração nos níveis de citocinas plasmáticas mesmo na presença ou ausência de estímulo danoso.

Figura 23 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ nos níveis de citocinas plasmáticas de animais tratados com salina ou LPS.



Nota: Níveis plasmáticos de IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-1 $\beta$  (C). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8-12 animais por grupo). Os símbolos representam o nível de significância: \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo veículo+salina.

Fonte: Da autora.

A análise estatística dos níveis de citocinas plasmáticas estão apresentados na tabela 22 e foram obtidos por meio da ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 22 - Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS em relação à concentração de citocinas plasmáticas.

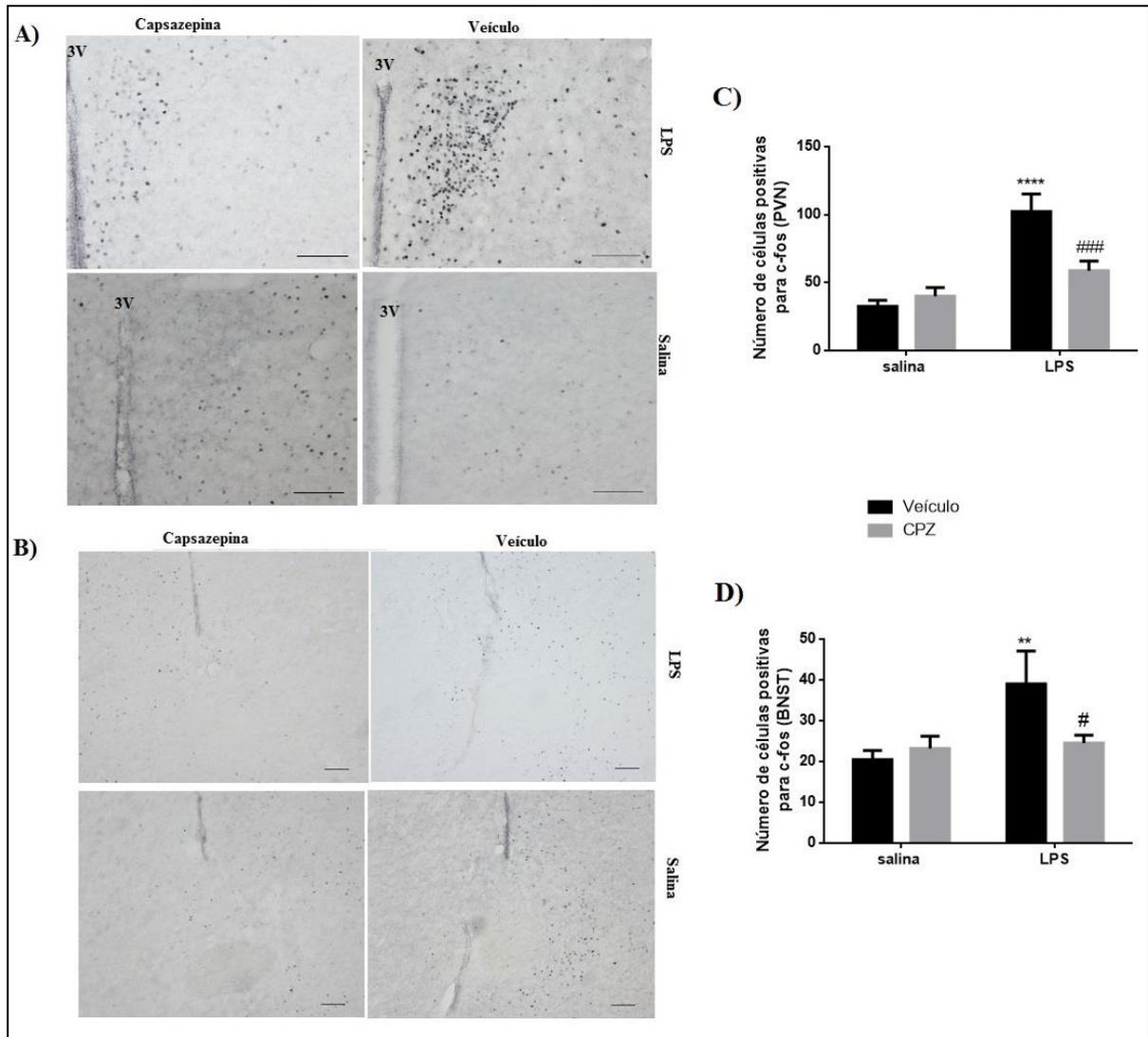
	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
<b>IL-6</b>	$F_{1,30}=0,14; p = 0,71$	$F_{1,30} = 29,39; p < 0,0001$	$F_{1,30}=0,25; p = 0,63$
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	$F_{1,37}=0,74; p = 0,40$	$F_{1,37} = 38,57; p < 0,001$	$F_{1,37}=1,73; p = 0,19$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	$F_{1,32}=0,53; p = 0,47$	$F_{1,32}=66,56; p < 0,0001$	$F_{1,32}=2,42; p = 0,13$

Fonte: Da autora

#### 6.2.2.8 Análise da ativação neuronal

Os animais tratados com LPS e pré-tratados com veículo tiveram um aumento significativo ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$  respectivamente) no número de células positivas para c-fos no PVN e BNST quando comparados ao grupo tratado com salina e mesmo pré-tratamento. O bloqueio dos receptores TRPV1, por sua vez, nos animais que receberam administração de endotoxina promoveu no núcleo paraventricular e da estria terminal a diminuição ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  respectivamente) do número destas células quando comparados aos animais pré-tratados com veículo, como demonstrado na figura 24 e análise estatística apresentada na tabela 23.

Figura 24 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de animais tratados com salina ou LPS.

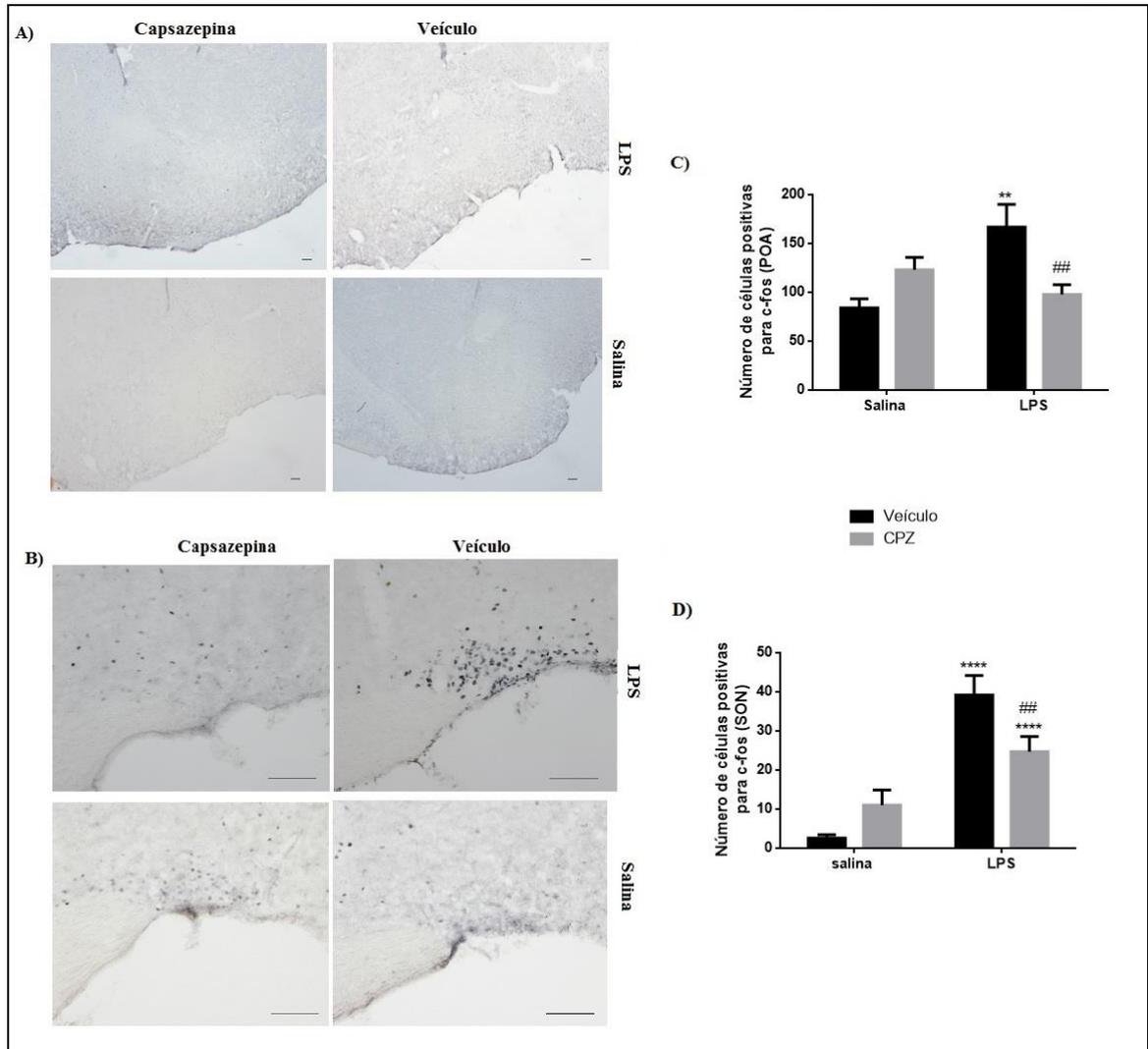


Nota: Núcleo Paraventricular - PVN (A) e (C), no Núcleo do leito da estria terminal- BNST (B) e (D). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 07-16 animais por grupo). As barras representam 100 $\mu$ m e os símbolos representam o nível de significância: \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo veículo+salina; #  $p < 0,05$  e ###  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo veículo+LPS.

Fonte: Da autora

Já a figura 25 mostra que os animais pré-tratados com veículo tiveram aumento ( $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$ ) do número de células positivas para c-fos na POA e SON quando tratados com LPS em comparação aos que receberam salina e o bloqueio dos receptores TRPV1, por sua vez, diminuiu ( $p < 0,01$  para ambos) o aumento provocado pela administração da endotoxina.

Figura 25 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ na expressão de células positivas para c-fos em encéfalo de animais tratados com salina ou LPS



Nota: Área preótica - POA (A) e (C), e no núcleo supraóptico- SON (B) e (D). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 06-11 animais por grupo). As barras representam 100 $\mu$ m e os símbolos representam o nível de significância: \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo veículo+salina; ##  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo+LPS.

Fonte: Da autora.

A análise estatística do número de células positivas para c-fos foi feita por meio da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls em que a variável pré-tratamento representa a administração de veículo ou CPZ e a aplicação de salina ou LPS a variável tratamento.

Tabela 23 - Análise de variância de duas vias dos grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS em relação ao número de células positivas para c-fos.

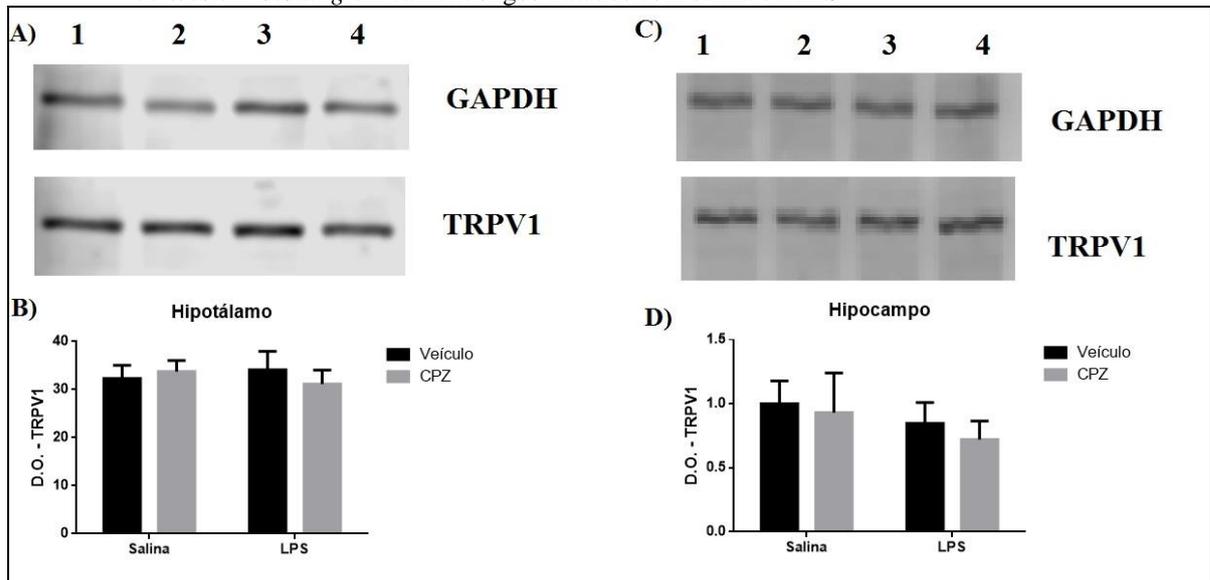
	Pré-tratamento	Tratamento	Interação
<b>PVN</b>	$F_{1,53}=4,36; p < 0,05$	$F_{1,53}= 26,85; p < 0,0001$	$F_{1,53}=8,91; p < 0,01$
<b>SON</b>	$F_{1,26}=0,85; p = 0,37$	$F_{1,26}= 59,72; p < 0,0001$	$F_{1,26}=12,37; p < 0,01$
<b>BNST</b>	$F_{1,33}=2,05; p = 0,16$	$F_{1,33}=5,82; p < 0,05$	$F_{1,33}= 4,42; p < 0,05$
<b>POA</b>	$F_{1,29}=1,03; p = 0,32$	$F_{1,29}=3,82; p = 0,06$	$F_{1,29}=13,38; p < 0,01$

Fonte: Da autora.

### 6.2.2.9 Análise da expressão dos receptores por *Western blotting*

Como é possível notar na figura 26, não houveram diferenças na densidade ótica das bandas com expressão corresponde a 100 kDa entre os grupos estudados tanto no tecido hipotalâmico quanto do hipocampo, o que sugere que não houveram alterações na expressão dos receptores TRPV1 nos tecidos encefálicos 2 horas após o tratamento com salina ou LPS, tendo os camundongos recebido administração prévia de veículo ou capsazepina.

Figura 26 - Efeito do pré-tratamento com veículo ou CPZ na densidade ótica das bandas reveladas pelo método de *Western blotting* em camundongos tratados com salina ou LPS.



Nota: Avaliação pelo programa ImageStudio. Figuras representativas dos grupos V+S (1), CPZ+S (2), V+LPS (3) e CPZ+LPS (4) em relação à análise no hipotálamo (A e B) e hipocampo (C e D). Os gráficos representam análise desitométrica das bandas reveladas com anticorpo anti-TRPV1. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 06-08 animais por grupo).

Fonte: Da autora.

A análise estatística está apresentada na tabela 24 e foi feita por meio de ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 24 - Análise de variância de duas vias de grupos pré-tratados com veículo ou CPZ e tratados com salina ou LPS em relação à densidade ótica de bandas reveladas no teste de *Western blotting*.

	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação</b>
<b>Hipotálamo</b>	$F_{1,25} = 0,06; p = 0,80$	$F_{1,25} = 0,02; p = 0,90$	$F_{1,25} = 0,54; p = 0,47$
<b>Hipocampo</b>	$F_{1,21} = 0,23; p = 0,64$	$F_{1,21} = 0,78; p = 0,39$	$F_{1,21} = 0,02; p = 0,89$

Fonte: Da autora.

## 7 DISCUSSÃO

A discussão dos resultados obtidos encontra-se a seguir.

### 7.1 TRPV1 NO SISTEMA RESPIRATÓRIO

A fim de determinar a dose de LPS e o tempo após administração mais adequados para a observação de alterações na mecânica respiratória provenientes da LPA/SDRA, foi feita a avaliação após administração intraperitoneal de veículo (salina) e das doses de 0,2, 1,0 e 5,0 mg/kg de LPS duas, seis e vinte e quatro horas após a aplicação.

Tendo em vista que as doses de 1,0 e 5,0 mg/kg de LPS aplicados intraperitonealmente foram capazes de promover alterações transcorridas 24 horas da aplicação, optou-se pela utilização das doses de lipopolissacarídeo e tempo supracitados para avaliar a participação dos receptores TRPV1. Para tanto utilizou-se a capsazepina (CPZ), antagonista de receptor TRPV1, na dose de 15mg/kg aplicada subcutaneamente (BHATIA et al., 2006) imediatamente antes da administração do LPS.

O estudo da mecânica respiratória por meio do respirador para pequenos animais permite a obtenção de parâmetros relacionados ao sistema respiratório como um todo (resistência, elastância e complacência do sistema respiratório) além de fornecer dados específicos como a resistência das vias aéreas ( $R_{aw}$ ), e resistência e elastância teciduais ( $G_{tis}$  e  $H_{tis}$  respectivamente). Sendo que a análise de parâmetros como  $R_{aw}$ ,  $G_{tis}$  e  $H_{tis}$ , têm sido utilizada em muitos estudos para a caracterização do sistema respiratório, pois permite a separação dos componentes centrais e vias aéreas dos componentes de tecido periférico (PINTO, 2008).

A resistência representa o impedimento à passagem de ar pelas vias aéreas ou atrito nos ductos aéreos (CARVALHO, ZIN, 2011) e a elastância, que é definida como o valor inverso da complacência (BERNARD; DAHLBY; HOENER, 1997), é representada principalmente pela dificuldade em se expandir os compartimentos alveolares (BATES, 2009). Por sua vez,  $H_{tis}$  e  $G_{tis}$  a priori refletem a função pulmonar periférica e podem indicar obstrução das vias aéreas periféricas por muco, por exemplo (CLOOTS et al., 2013).

Durante a LPA/SDRA, é marcante a redução da complacência (e consequente aumento da elastância) e aumento da resistência, tendo em vista a presença de edema intersticial e alveolar promovido pelo aumento da permeabilidade dos capilares na patologia, colapso alveolar devido a compressão dos mesmos pelo edema, além do espessamento das paredes das vias aéreas distais (BERNARD, 2005; DORAS et al., 2015; KOSOUR et al., 2014).

Nossos resultados evidenciam o aumento da resistência tecidual ( $G_{tis}$ ) e corroborando com eles é demonstrado que o LPS induz aumento da  $G_{tis}$  seguido de acréscimo de conteúdo de fibras elásticas (SANTOS, 2006), o que promove mudanças das propriedades intrínsecas do tecido (FREDBERG, 1993), e consequente aumento da heterogeneidade pulmonar (BATES et al., 1994; HANTOS et al., 1992; LUTCHEN, et al. 1996).

A elastância tecidual ( $H_{tis}$ ) também aparece aumentada em nossos resultados e alterações deste parâmetros podem indicar deterioração das propriedades elásticas e rigidez tecidual (HAMAKAWA et al., 2010; ITO et al., 2005), fatores que podem estar relacionados à presença e adesão de neutrófilos (PMN), que quando em contato íntimo com as células endoteliais são ativados e podem liberar enzimas proteolíticas, como a elastase que parece degradar as proteínas da junção epitelial levando ao enrijecimento tecidual (MORAES; ZURAWSKA; DOWNEY, 2006). Tal endurecimento tecidual também relaciona ao alargamento dos espaços aéreos (FORONJY et al., 2006) e consequente diminuição da resistência das vias aéreas ( $R_{aw}$ ).

Estudos em humanos investigaram pacientes com LPA indireta relacionada a causas abdominais e observaram um significativo aumento na elastância da parede torácica secundária ao aumento da pressão intra-abdominal (GATTINONNI et al., 1998; QUINTEL et al., 2004).

A histeresividade, dada pela razão entre resistência e elastância teciduais ( $\eta = G/H$ ), representa a relação da energia dissipada a cada ciclo respiratório com a energia acumulada, podendo ser usada como um indicativo de heterogeneidades (BATES, 2009). Alterações em  $\eta$  representam desbalanço entre energia dissipada e armazenada pelo pulmão, sendo que o rompimento de pontes cruzadas entre actina e miosina, alteração no filme de superfície durante a deflação, modificações no tecido conjuntivo e conservação imperfeita de energia devido recrutamento e desrecrutamento alveolar podem ser considerados fatores causais (CLOOTS et al., 2013).

O presente estudo aponta que os animais que receberam administração de LPS 5,0 mg/kg, quando avaliados após 24 horas da administração tiveram aumento de  $R_{rs}$ ,  $E_{rs}$ ,  $G_{tis}$ ,

$H_{tis}$  e diminuição de  $C_{rs}$  e  $R_{aw}$ , portanto alterações mecânicas compatíveis com as promovidas na LPA/SDRA, objeto de estudo do trabalho, validando assim o método utilizado.

Por todo o sistema respiratório existem canais TRP expressos em diferentes níveis de e em diversos tipos celulares, sendo que os do tipo V1 (TRPV1) vêm sendo alvo de grande interesse devido sua abundância, localização estratégica e função nas vias aéreas e homeostase pulmonar (DE LOGU et al., 2016). Os estudos a respeito da participação dos receptores TRPV1 no sistema respiratório não são abundantes, mas sabe-se que estão presentes ao longo de todo o sistema (fibras neuronais positivas para TRPV1 inervam todo trato respiratório – laringe, traqueia, vias aéreas superiores, parênquima pulmonar, alvéolos, músculos e vasos sanguíneos) e participam de estímulos de tosse, broncoconstrição, hiperreatividade e hipersecreção (GRACE et al., 2014; NILIUS et al., 2007; WATANABE et al., 2006).

Estudos apontam a capacidade da CPZ de impedir a broncoconstrição induzida pela inalação de ácido cítrico em cobaias (SATO; LOU; LUNDBERG, 1993) além de reduzir o aumento da resistência total pulmonar e a inflamação neurogênica (extravasamento de proteínas plasmáticas nas vias aéreas) provocada pela instilação intratraqueal de sulfato de hidrogênio (TREVISANI et al., 2005). O que vai ao encontro de nossos dados, que mostram que o bloqueio dos receptores TRPV1 pela capsazepina foi capaz de atenuar tanto o aumento de  $R_{rs}$  e quanto de  $G_{tis}$ .

É sabido que a LPA/SDRA promove influxo de líquido rico em proteínas para o interior dos alvéolos, fator que altera a integridade do surfactante, com lesão adicional ao tecido pulmonar e colapso alveolar (WIEDEMANN et al., 2006), o que pode ser verificado nos grupos tratados com LPS e que receberam pré-tratamento de veículo em nosso estudo.

Sendo a ruptura da barreira endotelial, capaz de permitir o extravasamento de líquido, muitas vezes dependente da entrada de íons cálcio do espaço extracelular (WU et al., 2005), o endotélio dos vasos extra-alveolares pode ser atingido e os vasos do septo parecem ser poupados (HEROLD; GABRIELLI; VADÁSZ, 2013). Ocorre que a barreira septal parece ser rompida a fim de promover inundação alveolar e assim prejudicar a troca gasosa e não com intuito de promover ruptura dos vasos extra-alveolares (HEROLD; GABRIELLI; VADÁSZ, 2013).

Embora as vias de entrada de  $Ca^{2+}$  envolvidas na regulação da integridade da barreira do septo alveolar não sejam elucidadas, sabe-se que os canais TRP estão envolvidos na ação de canais de  $Ca^{2+}$  no endotélio pulmonar (VILLALTA; TOWNSLEY, 2013; ALVAREZ et al., 2006; TIRUPATHI et al., 2002). Experimentos comprovaram o papel funcional dos

receptores TRPs (principalmente TRPV4) no endotélio pulmonar, em que a entrada de cálcio seria dependente dos receptores TRP na permeabilidade endotelial e integridade da barreira no sistema septo-alveolar (ALVAREZ et al., 2006; CIOFFI et al., 2009).

O rompimento de barreira septo-alveolar vulnerável, como as que resultam no influxo de cálcio via TRP, leva ao preenchimento alveolar com conseqüente prejuízo na troca gasosa. Além do mais, outros estudos mostram que a formação de acúmulo de fluido no espaço perivascular é suficiente para produzir mudanças na mecânica pulmonar (LOWE et al., 2007 e 2010).

O endotélio extra-alveolar possui vias de sinalização intrínsecas que, quando ativadas, levam ao extravasamento exclusivo de grandes vasos e aumenta a pressão das vias aéreas em qualquer volume pulmonar (complacência diminuída/elastância aumentada) e esta diminuição de complacência é atribuída à presença de fluido perivascular que aumenta a resistência tecidual sem acrescer a resistência das vias aéreas. A presença de fluido no espaço perivascular decorrente de extravasamentos pode afetar a interligação entre o feixe broncovascular e o parênquima, sendo que em situações normais uma interdependência mecânica das regiões pulmonares promove a manutenção das vias aéreas abertas. Entretanto, a presença de extravasamento perivascular pode interromper esta interdependência e promover o colapso alveolar e/ou aumentar a heterogeneidade tecidual, que acarreta no aumento da resistência tecidual (LOWE et al., 2007 e 2010).

Alguns trabalhos (DEVESA et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; WANG et al., 2008) demonstraram papel protetivo nos receptores TRPV1 em modelos experimentais de sepse. Embora ainda precisem ser identificados os neuropeptídeos específicos envolvidos na sepse, evidências sugerem que eles são sintetizados em regiões não neuronais, como células mononucleares e linfócitos (DEVESA et al., 2011; VILLALTA; TOWNSLEY, 2013) e podem ser produzidos de forma não dependente de TRPV1, principalmente em condições inflamatórias, entretanto, a participação do receptor TRPV1 em respostas inflamatórias no tecido pulmonar ainda é contraditória.

Em modelo de LPA induzida por LPS, o pré-tratamento com agonista de receptor TRPV1 inibiu tanto a infiltração de neutrófilos quanto o aumento de TNF- $\alpha$  e CINC-1 nos pulmões (TSUJI et al., 2010), mas a inflamação induzida por endotoxina e a hiperresponsividade brônquica foi melhorada em animais que não expressam estes receptores (HELYES et al., 2007).

Os parâmetros ventilatórios, foram medidos pelo método de pletismografia de corpo inteiro que permite a obtenção do volume pulmonar a partir da sua relação com as variações

de pressão no aparelho, entretanto, estudos indicam que para uma análise confiável no aparelho, o animal deve estar quieto durante a captação dos registros respiratórios, uma vez que a atividade muscular e a compressão pulmonar e/ou de gases gastrointestinais em decorrência da locomoção do animal podem modificar a pressão da câmara alterando o sinal gerado pela respiração (MORTOLA; FRAPPEL, 1998). Sendo o camundongo um animal muito ativo, mesmo embora ambientado ao aparato dias antes das medidas, encontramos muita dificuldade para realizá-las devido à exploração constante do animal.

Estudos sugerem que a inflamação, além do remodelamento, contribui de maneira significativa para o desenvolvimento de hiperresponsividade brônquica (HIZUME et al., 2012), sendo também qualquer mudança na musculatura lisa das vias aéreas, no epitélio, na mucosa e no parênquima pulmonar associada a alterações no processo de responsividade brônquica (LANÇAS, et al., 2006; DE MAGALHÃES, et al., 2005).

A responsividade das vias aéreas comumente é avaliada pelo desafio com broncoconstritores, sendo que o teste de broncoprovocação se baseia no fato de que a musculatura lisa brônquica, quando exposta a substâncias colinérgicas, reage com aumento do tônus, isto é, com broncoconstrição, sendo o teste realizado por meio da inalação de agentes farmacológicos como metacolina (MCh), carbacol e histamina (RUBIN et al., 2002).

Estudos ainda são contraditórios em relação à participação dos receptores TRPV1 na hiperresponsividade das vias aéreas. Em cobaias sensibilizadas com albumina, a inibição farmacológica do TRPV1 é indicada como inibidor da hiperresponsividade (DELESCLOSE; MACE; ADCOCK, 2012). Já camundongos deficientes em TRPV1 demonstraram aumento da hiperresponsividade brônquica (HELYES et al., 2007). Entretanto, nossos estudos não foram capazes de verificar quaisquer diferenças entre os parâmetros analisados.

A LPA/SDRA está entre as maiores causas de mortalidade em pacientes portadores de doenças críticas (TANG et al., 2014), sendo assim, analisou-se a mortalidade decorrente da administração sistêmica de LPS bem como o efeito do bloqueio dos receptores TRPV1, entretanto, nossos resultados não apontaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Estudos a respeito do papel dos receptores TRPV1 na SDMO e mortalidade decorrentes de sepse ainda são controversos e demonstram que o receptor atua de forma ainda incompreendida (GUPTILL et al., 2011), entretanto trabalhos apontam que o bloqueio com capsazepina diminuiu a taxa de sobrevivência, além de piorar a hipotensão decorrente da toxicidade induzida pelo LPS em ratos (WANG et al., 2008), mas também que, em camundongos, atuou de forma positiva, demonstrando o aumento das taxas de sobrevivência

além da diminuição de danos no fígado e pulmões com única administração 30min antes do procedimento de ligadura cecal com perfuração (CLP) (ANG; MOOCHHALA; BHATIA, 2010).

A variação de resultados pode estar relacionada com o uso de diferentes espécies, doses, tempos de administração e uso de agonistas e antagonistas diversos, o que sugere que o efeito do bloqueio dos receptores TRPV1 na sepse depende da forma indutora de sepse e do método de bloqueio dos receptores e dos neurônios que o expressam (GUPTILL et al., 2011).

Embora existam trabalhos a respeito do envolvimento dos receptores TRPV1 em processos inflamatórios no pulmão, o papel deles na fisiologia respiratória durante inflamação sistêmica ainda permanece indefinido.

Em conjunto, nossos resultados mostraram que o bloqueio farmacológico dos receptores TRPV1 com a capsazepina na LPA/SDRA induzida indiretamente por endotoxina modula o aumento da resistência do sistema respiratório e tecidual, além do colapso alveolar. Sendo assim, mostra-se que o TRPV1 exerce ação na LPA/SDRA induzida por endotoxina, fazendo do receptor possível alvo a fim de aumentar a eficácia terapêutica na LPA (CABRAL; GIUSTI-PAIVA, 2016).

## 7.2 TRPV1 E O COMPORTAMENTO DOENTIO

Em decorrência da infecção por microorganismo patogênico o hospedeiro sofre uma série de respostas imunes, fisiológicas, metabólicas e comportamentais mediadas pela ativação do sistema imune inato. Um típico indutor é o LPS, que quando administrado sistemicamente ou no encéfalo (ventrículo lateral) em animais de laboratório saudáveis desencadeia as respostas características do chamado comportamento doentio, com desenvolvimento de febre, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e mudanças comportamentais (DANTZER 2004 e 2009).

Dentre as alterações comportamentais típicas e estudadas no *sickness behavior* estão comportamento tipo-ansioso, tipo-depressivo, alteração de locomoção e ingestão alimentar, além da febre (DANTZER 2004 e 2009), como demonstrado no trabalho em questão.

Tendo em vista que os modelos comportamentais são boas ferramentas para identificar o curso e a gravidade do comprometimento imunológico (GRANGER et al., 2013) e que os testes de campo aberto, nado forçado, claro-escuro e suspensão pela cauda são bem descritos

pela literatura como métodos de avaliação (LIU et al., 2007), esses testes foram utilizados para estudar o efeito das doses de 100, 200, 500 e 1000 µg/kg de LPS após duas, seis e vinte e quatro horas da aplicação a fim da definição de dose e tempo mais apropriados para caracterização do estado doentio.

Para avaliação de comportamentos tipo-ansiosos, utilizou-se neste estudo o teste de Campo Aberto e Claro-Escuro. O teste de Campo Aberto permite a verificação da atividade motora voluntária e de comportamentos tipo-ansiosos, sendo a avaliação da atividade locomotora feita a partir da análise do número de cruzamentos totais que o animal realiza com as quatro patas nos quadrantes do aparato (WILCOXON et al., 2007), e o número de cruzamentos e tempo gasto no centro do aparato considerados inversamente relacionados ao nível de ansiedade (LIU et al., 2007). Já o teste Claro-Escuro oferece ao animal um conflito entre explorar o ambiente novo e evitar o compartimento claro, aversivo aos roedores (PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006) e é apontado como um bom instrumento para avaliação de comportamento tipo-ansioso (CRAWLEY; GOODWIN 1980).

O LPS é muito utilizado como indutor desse tipo de comportamento em doses que variam de 50 a 250µg/kg, e portanto, estaria relacionado à diminuição do tempo de permanência no compartimento claro e do número de cruzamento entre os ambientes (BANASIKOWSKI et al., 2015), além do aumento do CRF (fator liberador de corticotrofina, do inglês, *corticotrophin-releasing fator*), hormônio conhecido como promotor de ansiedade (HAUGER et al., 2009; OHMURA; YOSHIOKA, 2009; TURNBULL; LEE; RIVIER, 1998).

Os testes de suspensão pela cauda e nado forçado, por sua vez, são modelos bem estabelecidos utilizados para avaliação de efeitos antidepressivos que utilizam do desespero comportamental para análise de condutas tipo-depressivas em animais capazes de simular atitudes depressivas em humanos (DANG et al., 2009; YAN et al., 2015; WILLNER, 2005).

Porsolt e colaboradores em 1977 desenvolveram o teste de nado forçado que é muito empregado para avaliar a atividade antidepressiva de drogas devido a sua fácil utilização e a grande reprodutibilidade entre os laboratórios. O teste consiste em colocar o animal (rato ou camundongo) em um cilindro com água em temperatura agradável ao animal ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ). Inicialmente, o animal apresenta movimentos para tentar escapar do cilindro (por exemplo escalar o cilindro e nadar de um lado para o outro), mas após um certo tempo, o animal desenvolve uma postura quase imóvel. É sugerido que o comportamento de imobilidade refletiria um fracasso na tentativa de escapar do estímulo estressante (comportamento de desespero), o qual equivaleria ao retardo psicomotor observado em muitos pacientes deprimidos (WILLNER, 1984); ou ainda que a imobilidade pode ser um comportamento

adaptativo do animal para a manutenção de energia, ou um estado de desesperança no qual o animal perde a expectativa de fuga (PRESTON; WEST, 1990). Este teste é o mais utilizado em pesquisas acerca de depressão devido a sua validade preditiva e capacidade de reversão dos comportamentos característicos por grande variedade de antidepressivos disponíveis na atualidade (YAN et al., 2015)

O teste de suspensão pela cauda, por sua vez, é baseado nas mesmas premissas do nado forçado. Acredita-se que o animal submetido a uma situação estressante e inescapável apresente dois tipos de comportamentos alternados, a agitação, característica da tentativa de escape da situação de estresse, e a imobilidade. Este padrão de comportamento também pode ser chamado de *searching-behavior*, caracterizado pela alternância de intensa atividade motora e gasto de energia, com a imobilidade, sendo que, de maneira semelhante ao teste do nado forçado, fármacos antidepressivos são capazes de reduzir o tempo de imobilidade apresentado pelo animal (STÉRU et al., 1985).

Comportamento tipo-depressivo, redução da atividade locomotora, redução do comportamento exploratório, anorexia e anedonia, como descrito anteriormente, caracterizam o comportamento doentio que expressa o estado de motivação do animal frente a ativação do sistema imune, comumente feita pela administração de LPS (SONCINI et al., 2012); estando o aumento dos comportamentos tipo-depressivos e diminuição da atividade locomotora relacionados a comportamentos doentios adaptativos que mimetizam risco em resposta a ameaças potenciais no ambiente (BANASIKOWSKI et al., 2015).

Sendo assim, nossos estudos preliminares reafirmam a capacidade do LPS de produzir efeitos característicos do comportamento doentio (comportamento tipo-depressivo e ansioso) ao reduzir o número de cruzamentos no teste de Campo Aberto e Claro-Escuro, reduzir a permanência do animal no compartimento claro no teste Claro-Escuro, além de aumentar o tempo de imobilidade apresentado no teste de Suspensão pela Cauda. Esperava-se também que o LPS fosse capaz de aumentar o tempo de imobilidade no teste de Nado Forçado quando comparado aos animais tratados com salina, entretanto, possivelmente pelo número reduzido de animais expostos a esta análise inicial, não foi possível observar as alterações.

As doses utilizadas de LPS bem como o tempo entre a administração da droga e a avaliação variam de acordo com os modelos experimentais, entretanto, este trabalho, assim como estudos prévios de nosso laboratório julgaram como mais adequados a dose de 200 µg/kg para avaliação de camundongos duas horas após a administração em relação a testes envolvidos no comportamento doentio (SONCINI et al., 2012; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015).

Sendo assim, com tempo e dose de LPS estabelecidos, a capsazepina na dose de 5 mg/kg (NGUYEN et al., 2010) ou veículo (10mL/kg) foi administrada via intraperitoneal 30 minutos antes do tratamento com salina ou LPS e duas horas após a última aplicação os testes comportamentais foram realizados.

O teste de campo aberto, como exposto, possibilita a análise do comportamento doentio em termos de atividade motora com aspectos relacionados à ansiedade. A atividade locomotora do animal, é avaliada tomando-se como referência locomoção total do animal no aparato e eventos de *rearing*, que representa a exploração vertical do animal, já o tempo que o animal permanece no centro do aparato e o número de cruzamentos feitos nesta região são relacionados de forma inversa ao nível de ansiedade (LIU et al., 2007).

A preferência dos animais por movimentar-se próximo às paredes do aparato, onde sentem-se mais protegidos da possível ação de predadores, é expressa pelo tigmotaticismo (SIMON et al., 1994), e o efeito anti-tigmotático, obtido por meio da relação cruzamentos centrais/totais tido como alternativa de distinguir, ao menos em parte, medidas de atividade locomotora à comportamento tipo-ansioso, sendo animais com índices mais altos interpretados como menos "neofóbicos", assim o parâmetro é inversamente relacionado ao nível de ansiedade (ACEWICZ et al., 2014).

Nossos estudos evidenciaram que o bloqueio dos receptores TRPV1 foi capaz de atenuar a diminuição de cruzamentos centrais e do efeito anti-tigmotático provocada pelo tratamento com LPS, o que vai ao encontro de dados da literatura, que mostram que animais *knockout* para o receptor TRPV1 tiveram o efeito tipo-ansioso reduzido (MARSCH et al., 2007).

Entretanto, o número de cruzamentos totais e periféricos realizados pelos animais, que caracterizam a atividade locomotora do mesmo, não foram influenciados pelo bloqueio dos receptores TRPV1, o que também é consonante ao exposto na literatura, que mostra que não foram alterados parâmetros de mobilidade em animais *knockout* para o TRPV1 nem nos tratados com seus agonistas ou antagonistas (capsaicina ou capsazepina) (MANNA; UMATHE, 2011; MARSCH et al., 2007). Sendo assim, os receptores TRPV1 parecem não estar relacionados à atividade locomotora dos camundongos.

O teste de claro-escuro, como dito anteriormente, é utilizado para avaliação de comportamento tipo-ansioso, sendo o período de permanência no compartimento claro inversamente relacionado à ansiedade (BANASIKOWSKI et al., 2015). Assim, os animais tratados com LPS tiveram aumento no comportamento tipo-ansioso, como é esperado, e o bloqueio dos receptores TRPV1 atenuou tal efeito, além de convergir aos anteriores,

mostrando, mais uma vez, que a questão exploratória foi influenciada (diminuída) pelo LPS, entretanto, o pré-tratamento com CPZ não promoveu nenhuma alteração no número de cruzamentos feitos pelos animais.

Marsch e colaboradores por sua vez demonstraram que animais *knockout* para os receptores TRPV1 não apresentaram diferenças na distância percorrida durante teste de campo aberto e claro-escuro, quando comparados a animais selvagens, entretanto, os mesmos exploraram mais o compartimento claro, mostrando comportamento tipo-ansioso reduzido em animais deficientes para o receptor TRPV1 (MARSCH et al., 2007).

Já Manna e Umathe apontam que a administração intracerebroventricular de capsaicina, agonista do receptor TRPV1, promoveu diminuição da interação social indicando a indução de comportamento tipo-ansioso e de forma oposta, a capsazepina foi capaz de aumentar a interação nos animais. Além disso, mostram também que a atividade locomotora dos animais não foi influenciada pelas drogas, evidenciando mais uma vez que os receptores TRPV1 não participam desta modulação (MANNA; UMATHE, 2011).

Diversos outros estudos apontam que o bloqueio dos receptores TRPV1 atua de forma a diminuir efeito tipo-ansioso em ratos e camundongos (BATISTA; FOGAÇA; GUIMARÃES, 2015; CASAROTTO et al., 2012; HAKIMIZADEH et al., 2012; KASCKOWA; MULCHAHEYB; GERACIOTI JR, 2004; LISBOA et al., 2013; TERZIAN et al., 2009), entretanto, não foi encontrado estudo que demonstrasse a participação neste tipo de comportamento advindo da endotoxemia.

O comportamento doentio também é caracterizado por comportamento tipo-depressivo dos animais, como já descrito, e para avaliar a atuação dos receptores TRPV1 nesse processo, foram realizados os testes de nado forçado e suspensão pela cauda.

A imobilidade é apontada como estado de desespero comportamental no qual os animais não estão estimulados a tentar escapar da situação a que estão submetidos e é relacionada ao estado tipo-depressivo, sendo que drogas antidepressivas reduzem a imobilidade dos animais (LIU et al., 2007). Portanto, a capsazepina se mostra capaz de reduzir o comportamento tipo-depressivo característico do comportamento doentio no teste de Nado Forçado devido a diminuição provocada, em animais tratados com endotoxina, do tempo de imobilidade.

Embora os testes do nado forçado e da suspensão pela cauda observem parâmetros semelhantes, muitos estudos indicam que eles diferem no que diz respeito aos substratos biológicos envolvidos nas respostas, mesmo apresentando respostas convergentes diante fármacos antidepressivos (BAI et al., 2001; BOURIN et al., 2005; RENARD et al., 2003).

Sabe-se que fármacos antidepressivos podem reduzir a duração da imobilidade no teste de Suspensão pela Cauda em doses menores que as necessárias para produzir o mesmo efeito no Nado Forçado (LIU; GERSHENFELD, 2001). Essas diferenças na resposta farmacológica sugerem a possível existência de mecanismos distintos para produção de imobilidade em cada teste, com sobreposições e distinções.

Estudos indicam que o sistema dopaminérgico é fundamental para performance dos animais no teste de Nado Forçado, enquanto tanto o dopaminérgico quanto o serotoninérgico são envolvidos no teste de Suspensão pela Cauda (CHATTERJEE; JAISWAL; PALIT, 2012), além de indicarem que o Teste de Suspensão pela Cauda seja menos estressante que o teste de Nado Forçado devido a ausência do contato com água e possível indução de hipotermia pela imersão (THIERRY et al., 1986). Entretanto, David e colaboradores mostraram que a redução da temperatura corpórea do animal em decorrência do contato com água fria no teste não foi relacionada a alterações no tempo de imobilidade dos animais, sugerindo assim que as alterações na imobilidade apresentada no Teste de Nado Forçado não estão relacionadas a variações na temperatura corpórea dos animais (DAVID et al., 2001). Porsolt e colaboradores mostraram que, em ratos, as alterações de termorregulação podem ser claramente dissociadas dos efeitos comportamentais produzidos pelo teste de Nado Forçado e uso de antidepressivos (PORSOLT et al., 1979)

Diante do exposto, observa-se que mesmo os Testes de Nado Forçado e Suspensão pela Cauda sendo amplamente usados como modelos de análise para comportamento tipo-depressivo em camundongos devido a facilidade de reprodução e boa resposta a antidepressivos (DEUSSING, 2006; DUMAN, 2010), eles diferem em alguns aspectos, indicando possíveis distinções nos mecanismos envolvidos, o que pode justificar a diferença de resultado por nós encontrada.

Além da redução da atividade locomotora, comportamento tipo-depressivo e ansioso mostrados anteriormente, a resposta de fase aguda ao desafio imunológico também promove a redução da ingestão de alimentos. Para caracterizar o efeito do bloqueio dos receptores TRPV1 no processo, foi realizada a análise da ingestão alimentar e ganho de peso após a administração de LPS e salina durante vinte e quatro horas.

Verificamos a diminuição do comportamento ingestivo e do peso dos animais submetidos ao desafio imunológico, o que vai ao encontro de dados mostrados na literatura (SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015). A administração de CPZ, por sua vez não foi capaz de provocar alterações, sugerindo, assim, ausência de participação do receptor TRPV1 na regulação do processo de ganho de peso e ingestão de alimentos.

Estudos acerca da real participação dos receptores TRPV1 no controle da ingestão de alimentos bem como no ganho de peso ainda são controversos. Choowanthanakorn e colaboradores, em seus estudos notaram ausência de diferença na ingestão de alimentos entre animais com ausência do receptor TRPV1, todavia diferenças no ganho de peso foram observadas, indicando a participação deste receptor no controle de mecanismos metabólicos (CHOOWANTHANAPAKORN et al., 2015). Entretanto, outros estudos apontam que animais *knockout* para o receptor TRPV1 tratados com dieta de laboratório padrão, por sua vez, não apresentaram alterações no ganho de peso quando comparados a animais que expressam o receptor, o que assim como nossos dados, sugere a ausência de modulação do ganho de peso corporal por meio do receptor em questão (KENTISH et al., 2015, LEE et al., 2015).

As alterações comportamentais que advêm da endotoxemia são essenciais para a sobrevivência do animal devido ao redirecionamento de energia, como exposto. As respostas termorregulatórias, que levam à febre, também fazem parte dos processos adaptativos, uma vez que criam ambiente desfavorável ao patógeno e aumentam a eficácia da resposta imune por propiciar o aumento da capacidade fagocítica de neutrófilos e também a imunidade adaptativa, induzindo a proliferação de linfócitos e a produção de anticorpos (MOLTZ, 1993; KLUGER, 1986).

Foi observado neste estudo a capacidade do LPS de promover aumento da temperatura corpórea do animal, sendo a administração prévia de capsazepina capaz de inibir tal hipertermia.

Sabe-se que o LPS medeia a liberação de citocinas por células imunológicas que induzem por vias neurais ou humorais a produção de prostaglandinas, responsáveis pela ativação de neurônios termossensíveis na POA, gerando o estado febril (BLATTEIS, 2006). E sugere-se que periféricamente o receptor TRPV1 possa funcionar como espécie de termossensor direcionando estímulo para neurônios da área pré-óptica (POA) do hipotálamo que regula mecanismos de perda de calor (CATERINA, 2007; MILLS et al, 2008).

Diversos estudos mostram que a ativação dos receptores TRPV1 desencadeiam hipotermia em roedores e indicam ainda que antagonistas do receptor produzem hipertermia em diferentes espécies (rato, cachorro, macaco e inclusive em humanos) (GAVVA, 2008; RAWLS, BENAMAR, 2014). Entretanto, camundongos *knockdown* para o receptor TRPV1 não apresentaram tal hipertermia (TOTH et al., 2011) além dos *knockout* apresentarem resposta febril ao LPS atenuada (IIDA et al, 2005).

Os receptores TRPV1 parecem atuar de maneira neural respondendo a sinais provenientes das vísceras em situações normais, com ativação capaz de promover a inibição de mecanismos de defesa ao frio e de suprimir a temperatura corpórea, sendo tal ativação possivelmente modulada in vivo por endovanilóides e baixo pH, estímulos capazes de evocar mudanças na temperatura corpórea central, entretanto, os detalhes de tal modulação fisiológica ainda permanece desconhecidos. Agonistas e antagonistas exógenos, por sua vez, atuam de acordo com o tipo de ação nos receptores TRPV1, sendo que os antagonistas agem em neurônios periféricos e os agonistas agem centralmente na área pre-óptica (POA) do hipotálamo (AYOUB; HUNTER; SIMMONS, 2009; ROMANOVSKY, et al., 2009).

A hipertermia induzida por antagonistas dos receptores TRPV1 pode ser relacionada pela ativação dos mesmos pelo calor, prótons ou agonistas químicos, tendo em vista estudos que relacionam a hipertermia induzida por antagonistas de TRPV1 à sua potência de bloquear a ativação do receptor induzida por prótons (GARAMI et al., 2010). Antagonistas que bloqueiam a ativação por calor e por estímulos químicos apresentam efeitos mínimos ou nenhuma hipertermia, e o AMG8562, antagonista do receptor TRPV1, potencializa seletivamente a ativação por prótons também não é capaz de promover acréscimo de temperatura (BISHNOI; PREMKUMAR, 2011; GARAMI et al., 2010; LEHTO et al., 2008).

Tendo em vista, então, o fato do canal utilizar de diferentes mecanismos para promover o bloqueio dos receptores TRPV1 e portanto que os antagonistas podem bloquear a ativação de acordo com o agonista, é estabelecido que a capsazepina não é capaz de promover a hipertermia devido a sua incapacidade de antagonizar os receptores TRPV1 quando ativados por prótons (AYOUB; HUNTER; SIMMONS, 2009; ROMANOVSKY, et al., 2009).

A regulação da atividade do eixo HHA, secreção hormonal, comportamento e proliferação celular é feita sobretudo pelas citocinas, responsáveis pela comunicação entre os sistemas imune e neuroendócrino (DANTZER, 2009) elas são elementos fundamentais para que o organismo responda de forma apropriada ao agente infeccioso não apenas pela participação na modulação da resposta febril, mas também pela modulação das alterações comportamentais promovidas como já descrito. A produção de citocinas, em especial as inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  aliada à uma maior síntese de prostaglandinas leva ao aparecimento do comportamento doentio pela estimulação da atividade do eixo HHA e consequente aumento dos níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e glicocorticoides (BANKS; ERICKSON, 2010; MCCUSKER; KELLEY, 2013).

Elas alcançam o sistema nervoso central por transportadores específicos localizados na barreira hematoencefálica ou pelos órgãos circumventriculares, podendo a sinalização ser

realizada pelos nervos periféricos ou induzir a produção de prostaglandinas na interface entre o cérebro e a corrente sanguínea (ENGBLOM et al., 2002). Os mediadores alcançam direta ou indiretamente neurônios e células de apoio (microglia e astrócitos) e promovem alterações no sistema nervoso autônomo e endócrino, regulando a resposta do indivíduo à infecção (MARTIN, 2013).

IL-6 tem notável efeito pirogênico e modula atividades corticotrópicas, mas não influencia na atividade comportamental de forma direta, uma vez que as citocinas não agem separadamente, e sim em conjunto para que os efeitos sejam pronunciados. Estudos com camundongos *knockout* para IL-6 mostraram-se menos sensíveis aos efeitos comportamentais do LPS, o que sugere, desta forma, que a IL-6 potencializa efeitos depressivos produzidos pela IL-1 $\beta$ , a principal citocina moduladora do comportamento doentio (DANTZER, 2009).

O TNF, por sua vez é conhecido como pirogênio endógeno, que age no eixo hipotálamo-hipofisário e possui ações imunoestimulatórias importantes no combate de infecções, provocando a liberação de neutrófilos, produção de superóxidos, lisozimas e ativação de macrófagos (DINARELLO, 2004). Além do mais, é proposto que o TNF- $\alpha$  desempenha um papel criogênico endógeno na modulação da resposta febril (LONG et al., 1992; LEON et al., 1997), sendo a concentração plasmática de TNF- $\alpha$  aumentada após a indução da endotoxemia, com concentração máxima ocorrendo entre uma ou duas horas após a aplicação do LPS (BUENO et al., 1999).

Já a IL-1 $\beta$  está intimamente relacionada ao comportamento doentio, uma vez que sua administração central ou periférica induz os efeitos do comportamento de fase aguda, incluindo febre, ativação do eixo HHA e comportamento tipo-depressivo. Camundongos deficientes em caspase 1 (enzima conversora da forma inativa na forma madura do IL-1 $\beta$ ) são menos sensíveis aos efeitos tipo-depressivos do LPS, como na ingestão de alimentos, quando administrados intracerebroventricularmente (DANTZER, 2009).

A ação das citocinas ocorre de maneira conjunta, sendo que a deficiência em uma delas pode ser compensada por outra (DANTZER, 2009), ocorrendo níveis aumentados em animais com endotoxemia induzida por LPS, como evidenciado em nossos resultados.

Sabe-se que o receptor TRPV1 é expresso em células do sistema imune, incluindo mastócitos, linfócitos e células dendríticas, o que sugere que a ativação do mesmo pode ser fator de estímulo para células imunes e aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (HUANG et al., 2015). Camundongos *knockout* para o receptor apresentaram aumento da concentração de citocinas peritoneais, já o Rutênio *Red* (antagonista não seletivo do receptor

TRPV1) contraditoriamente, impediu a síntese de TNF- $\alpha$  e IL-6 nos macrófagos quando induzidos por LPS (GUPTILL et al., 2011).

Wang e Wang, em seus experimentos, também mostraram um aumento dos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em animais *knockout* para os receptores TRPV1 quando comparados aos selvagens após a administração de LPS. Entretanto, é difícil comparar tal estudo com nosso devido a diferenças como os modelos animais utilizados, o tempo de coleta de sangue (6 horas no estudo e 2 horas em nossos experimentos após aplicação de LPS) e a dose de LPS (WANG, WANG, 2013). Guptill e colaboradores também descreveram que animais submetidos ao modelo de CLP e tratados com resiniferatoxina tiveram diminuição dos níveis de TNF (GUPTILL et al., 2011).

Contraditoriamente, outro estudo mostra que quatro horas após a administração de LPS os níveis de TNF plasmáticos não foram alterados em animais *knockout* quando comparado à linhagem selvagem, sugerindo assim que o TRPV1 parece não ser um modulador dos níveis de TNF $\alpha$  (CLARK et al., 2007). Isso também foi abordado por estudo que obteve níveis inalterados de TNF $\alpha$  em modelo de artrite em que animais *knockout* para o receptor apresentaram hipoalgesia. Entretanto, o mesmo estudo mostrou que os níveis da citocina no fluido peritoneal foram aumentados nos animais *knockout*, quando comparados aos padrões após a administração de endotoxina, sugerindo que a ativação local dos receptores TRPV1 no peritônio parece influenciar diretamente a produção de TNF- $\alpha$  (CLARK et al., 2007, KEEBLE et al., 2005). Em contrapartida foi demonstrado também a estimulação dos receptores TRPV1 promoveria o aumento da produção da citocina IL-6 (LOWIN et al., 2015).

Como visto, sugere-se que a produção de citocinas possa ser influenciada pelo receptor TRPV1, entretanto a maneira exata como isso acontece ainda não é clara.

A produção de IL-1 $\beta$ , estimulada pela administração de LPS, atua na barreira hematoencefálica estimulando a síntese de prostaglandinas que difundem pelo parênquima e estimulam células que possuam receptores para tal mediador nas regiões encefálicas, como na área pré-óptica (*preoptic area*- POA), núcleo paraventricular (*paraventricular nucleus*- PVN) e supraóptico (*supraoptic nucleus* - SON), conhecidas regiões encefálicas envolvidas na febre e respostas neuroendócrinas à ativação imune periférica (KONSMAN et al., 2004).

As infecções periféricas promovem as alterações comportamentais também por meio de estímulos neurais enviados ao encéfalo por meio do nervo vago que projeta para diversas regiões como PVN, SON e BNST (núcleo do leito da estria terminal, do inglês *bed nucleus the stria terminalis*), e por meio da ativação por infecção abdominal/visceral influencia a

atividade de regiões como as supracitadas que são relacionadas à motivação e humor (MCCUSKER; KELLEY, 2013).

A quantificação de células positivas para c-fos é uma metodologia utilizada para avaliar o aumento da atividade neuronal que geralmente ocorre após um estímulo nocivo, devido a relação entre a expressão de c-fos e eventos genômicos que controlam mudanças no SNC. A administração periférica de LPS induz ativação neural em diversas regiões encefálicas, sendo que estudos mostram a expressão aumentada de c-fos em camundongos machos adultos que receberam administração de LPS em diversas regiões encefálicas como a dorsomedial, dorsal, lateral, núcleo pré-óptico anterior do hipotálamo, núcleo do leito da estria terminal, área postrema, núcleo do trato solitário e núcleo paraventricular do hipotálamo (WANNER et al., 2013). Este estudo mostra que o LPS foi capaz de aumentar o número de células positivas para c-fos nas regiões encefálicas PVN, BNST, POA e SON, sendo o bloqueio dos receptores TRPV1 por meio da capsazepina capaz de atenuar tal acentuação promovida.

Iida e colaboradores estudaram diversas áreas encefálicas relacionadas à termorregulação, já que assim como nossos estudos, encontrou resposta febril ao LPS atenuada (animais *knockout* para o receptor TRPV1), entretanto, ao avaliar a área pré-óptica medial (mPOA), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), núcleo do trato solitário e área postrema, apesar de também observarem a expressão aumentada de c-Fos nos animais tratados com LPS quando comparados ao controle (salina), não detectaram diferenças entre animais *knockout* e os selvagens. O próprio estudo indica ainda a possibilidade de mecanismos compensatórios nos camundongos modificados geneticamente, uma vez que a resposta destes animais ao LPS foi febre atenuada (IIDA et al., 2005).

O BNST está relacionado à ansiedade, sendo que estudos conduzidos com canabidiol, proposto como antagonista CB1 e CB2 e agonista TRPV1, mostraram que sua administração sistêmica diminuiu a expressão de c-fos induzida pelo medo na região, o que difere de nossos achados. Entretanto, além do tipo de estímulo ser distinto entre nosso estudo (LPS) e o de Lemos (medo condicionado), ainda não se sabe com exatidão os alvos e mecanismos como o composto age e sua real interação com os receptores TRPV1 (LEMOS; RESSTEL; GUIMARÃES, 2010).

É sabido que neurônios do SON expressam os receptores TRPV1 e que os mesmos participam das respostas neuroendócrinas ao desafio imunológico (NEDUNGANDI et al., 2012). Tal receptor é apontado como importante mediador da sensibilidade térmica de células

magnocelulares neurosecretoras do núcleo supraóptico (SUDBURI; BOURQUE, 2013), sendo assim sugere a participação do TRPV1 como modulador da atividade do SON.

Apesar dos achados que relacionam os receptores TRPV1 a ativação de diversas regiões encefálicas, inclusive àquelas abordadas neste trabalho, não encontrou-se associação com a modulação do comportamento doentio, como este estudo.

É sabido que estes receptores, expressos em diversas regiões do sistema nervoso central (hipotálamo, cerebelo, córtex, bulbo olfatório, hipocampo e tálamo), quando sensibilizados por agentes proinflamatórios podem sofrer aumento da expressão a longo prazo ou ainda uma modificação aguda no canal (DEVESA et al., 2011).

Pesquisadores observaram que 6 horas após a administração de LPS, ratos apresentaram aumento da expressão de receptores TRPV1 em tecido oral (ORLIAC et al., 2007), o que corrobora com a proposta destes receptores contribuírem no desencadeamento de efeitos deletérios como na sepse (KOHRO et al., 2004) e choque hemorrágico (RANDALL et al., 2002) e associaram o aumento dos níveis de anandamida durante o choque endotoxêmico como fator envolvido no aumento da expressão dos receptores TRPV1 (ORLIAC et al., 2007). Especificamente na POA, estudos mostraram também a expressão de receptores TRPV1 aumentada durante febre induzida por LPS em ratos, provavelmente regulada por HSF1 (fator de choque térmico, do inglês, *heat shock factor 1*) (FAN-XIN et al., 2012).

Trabalhos demonstram ainda o aumento da expressão de TRPV1 em outras doenças inflamatórias, entretanto sabe-se que citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 podem também regular o funcionamento do receptor, aumentando excitabilidade neuronal (DEVESA et al., 2011) sem alterar sua expressão. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são capazes de super-regular TLR4, que por sua vez aumentam a atividade basal do TRPV1, uma vez que neurônios *knockout* para TLR4 têm atividade do receptor diminuída, entretanto não se sabe a forma exata como isso ocorre (MIN et al., 2014).

Sendo assim, devido a capacidade dos receptores TRPV1 sofrerem alteração dos níveis de expressão transmembrana (LAINEZ et al., 2010), por meio da técnica de *Western Blotting* foi analisada sua manifestação no hipotálamo e hipocampo a fim de avaliar se as alterações decorrentes do bloqueio dos receptores poderiam ser mediadas pela expressão modificada dos mesmos. As bandas correspondes a 100 kDa, coincidente com o peso molecular descrito do TRPV1 em encéfalo (TOTH et al., 2005), foram analisadas, entretanto não foram observadas alterações na densidade óptica entre os grupos estudados, o que pode ser justificado pela possível modificação de atividade dos receptores ou pela diferença entre o

presente estudo e os modelos animais, tecido, estímulos e tempos após administração LPS apresentados na literatura.

É sabido que, quando em excesso, as citocinas pró-inflamatórias produzidas frente a presença de patógeno promovem mudanças comportamentais e febre, como já explicitado anteriormente por meio do processamento das informações da periferia para o encéfalo que pode ser mediado pelo nervo vago, que possui células dendríticas que expressam TLRs e produzem IL-1 $\beta$  em resposta à administração de LPS (DANTZER, 2009; EK et al., 1998; ROSAS-BALLINA et al., 2015).

A participação do nervo vago na transmissão de informação é confirmada por meio de estudos que utilizam a técnica de vagotomia (secção do nervo), nos quais foi observada a ação fundamental de aferentes vagais na modulação do hipotálamo, tronco encefálico e estruturas límbicas. A expressão de c-fos no nervo vago mostra-se atenuada em animais seccionados e com isso, o comportamento doentio promovido pela administração de LPS é abolido. Entretanto, o nervo não transmite para o encéfalo apenas sinais relacionados a aspectos comportamentais em decorrência das citocinas, uma vez que a secção do vago altera também a ativação do eixo hipófise-adrenal e resposta febril (DANTZER, 2004; DANTZER, 2009; FLESHNER et al., 1995; WATKINS et al., 1995), embora a atuação dos aferentes vagais seja menos expressiva em relação à febre, já que ratos vagotomizados apesar de não desenvolverem comportamento doentio ainda são capazes de desenvolver febre (KONSMAN et al., 2000), apesar da atenuação (ROMANOWSKY, 2000).

Animais vagotomizados não apresentam alteração nos níveis plasmáticos de citocinas, mostrando que a resposta comportamental alterada nos animais, não representa uma reação diminuída aos níveis periféricos desses mediadores, que têm grau aumentado com o desafio imunológico. Entretanto, quando IL1 $\beta$  administrada via não-intraperitoneal, como subcutânea, intravenosa e intracerebroventricular, o comportamento doentio ocorre normalmente, evidenciando a participação de aferentes vagais na indução do comportamento doentio (BLUTHE et al., 1994; BLUTHE et al., 1996; DANTZER, 2009; MCCUSKER; KELLEY, 2013). Portanto, mais do que transmitir mensagem sensorial, o nervo vago pode sinalizar respostas complexas que integram muitos eventos periféricos (ZHAO et al., 2010).

Neurônios aferentes vagais expressam diversos canais iônicos, dentre eles, o TRPV1 que é dito como capaz de influenciar a sinalização através da determinação do limiar para deflagração do potencial de ação nas terminações (WU; LINDGBERG; PETERS, 2016; ZHAO et al., 2010).

Devido a abundância desses receptores em certos subtipos vagais (YU; HU; YU; 2015) o TRPV1 vem sendo estudado e relacionado a alguns processos fisiológicos. É sugerida participação dos mesmos como moduladores de aferentes vagais sobretudo associando-se ao sistema respiratório (BIRRELL et al., 2014), mas relacionaram também à pancreatite (SCHWARTZ et al., 2011) e à acidificação gástrica (YOSHIMURA et al., 2016), entretanto até o presente momento não foram encontrados estudos que os relaciona ao comportamento.

É sugerido que o TRPV1 estimula a produção de vesículas de glutamato em resposta a capsaicina e altas temperaturas (ANDRESEN; HOFMANN; FAWLEY, 2012; PETERS et al., 2010; SHOUDAI et al., 2010) e que conseqüentemente também aumenta a liberação de GABA em neurônios do núcleo dorsal motor do nervo vago (DMV, do inglês, *dorsal motor nucleus of the vagus*) (DERBENEV et al., 2006; DERBENEV; SMITH, 2013).

O glutamato, por sua vez, representa um importante neurotransmissor excitatório no SNC relacionado à indução de c-fos no encéfalo por meio de endotoxina. Sabendo que grande parte das fibras aferentes vagais são glutamatérgicas, estudo mostrou a capacidade de antagonistas do receptor de glutamato de impedir a indução de c-fos nas projeções vagais primárias e secundárias no encéfalo, entretanto a forma exata como age permanece indefinida (DANTZER, 2004; WAN et al., 1994).

Portanto, sendo o glutamato neurotransmissor excitatório que pode promover ativação encefálica e os TRPV1 capazes de influenciar produção de suas vesículas, tais receptores podem mediar a ativação das regiões encefálicas responsáveis pela modulação do comportamento por meio do glutamato.

No presente estudo, a exemplo da vagotomia citada anteriormente, é visto que os níveis de citocinas plasmáticas não são alterados após a administração de LPS nos animais que receberam pré-tratamento com capsazepina quando comparados àqueles que receberam veículo e que os comportamentos tipo-depressivos e ansiosos, aumento de temperatura corpórea além do número de células positivas para c-fos no PVN, SON, BNST e POA foram atenuados. Isso sugere a possível ação mediadora dos receptores TRPV1 na sinalização realizada pelo nervo vago para transmissão de estímulos provenientes da infecção da periferia para o encéfalo.

Diante do exposto, nota-se que os receptores TRPV1 parecem modular a transmissão do estímulo promovido pela administração intraperitoneal de LPS para o SNC. Assim, o bloqueio destes receptores atenua a ativação neuronal de áreas responsáveis pelo controle termorregulatório e dos comportamentos tipo-ansiosos e depressivos.

## 8 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o bloqueio do receptor TRPV1 diminui o aumento da resistência do sistema respiratório e resistência tecidual além do colapso alveolar promovidos pela administração intraperitoneal de LPS, demonstrando assim a participação dos receptores TRPV1 na lesão aguda pulmonar/síndrome da disfunção respiratória aguda (LPA/SDRA). Portanto, bloqueadores dos receptores em questão devem ser alvo de mais estudos para o possível uso no aumento da eficácia do tratamento da LPA/SDRA (CABRAL; GIUSTI-PAIVA, 2016).

Já em relação a participação dos receptores TRPV1 na modulação do comportamento doentio, foi observado que o bloqueio dos receptores por meio da administração de capsazepina quando na presença de LPS promoveu a redução dos comportamentos tipo-depressivo e ansioso, bem como a atenuação da febre e da expressão de c-fos nas regiões encefálicas relacionadas, o que sugere a participação dos mesmos na modulação do comportamento doentio.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5. ed.. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- ACEWICZ, A.; MIERZEJEWSKI, P.; JASTRZEBSKA, A. et al. Anxiety- and depressive-like traits in Warsaw alcohol high-preferring (WHP) and Warsaw alcohol low-preferring (WLP) rats. **Pharmacol Biochem Behav**. v.122, p. 261-265, 2014.
- AGUIAR, D.C.; MOREIRA, F.A.; TERZIAN, A.L. et al. Modulation of defensive behavior by Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 (TRPV1) Channels. **Neurosc and Biobeh Ver**. v. 46, p. 418-428, 2014
- AKAMINE, N.; SILVA, E.; FERNANDES JÚNIOR, C.J. et al. Fisiopatologia do choque e da disfunção de múltiplos órgãos. In: KNOBEL E. **Condutas no paciente grave** (volume1). 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 41-78.
- ALAWI, K.M.; AUBDOOL, A.A.; LIANG, L. et al. The sympathetic nervous system is controlled by transient receptor potential vanilloid 1 in the regulation of body temperature. **FASEB J**. v. 29, n. 10, p. 4285-4298, 2015.
- ALVAREZ, D.F.; KING, J.A.; WEBER, D. et al. Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury. **Circ Res**. v. 99, n. 9, p. 988-995, 2006.
- AMATO, M.B.P. CARVALHO, C.R.R.; ISOLA, A. et al. Ventilação mecânica na lesão pulmonar aguda (LPA)/síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). In: III Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. **J Bras Pneumol**. v. 33. p. S-119-127, 2007.
- ANDRESEN, M.C.; HOFMANN, M.E.; FAWLEY, J.A. The unsilent majority-TRPV1 drives “spontaneous” transmission of unmyelinated primary afferents within cardiorespiratory NTS. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 303, p. R1207–R1216, 2012.
- ANG, S.F.; MOOCHHALA, S.M.; BHATIA, M. Hydrogen sulfide promotes transient receptor potential vanilloid 1-mediated neurogenic inflammation in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med**. v. 38, p. 619 –628, 2010.
- AOKI, H.; MOGI, C.; OKAJIMA, F. Ionotropic and metabotropic proton-sensing receptors involved in airway inflammation in allergic asthma. **Mediators Inflamm**. 2014.

AYOUB, S.S.; HUNTER, J.C.; SIMMONS, D.L. Answering the burning question of how transient receptor potential vanilloid-1 channel antagonists cause unwanted hyperthermia. **Pharmacol Rev.** v. 61, n. 3, p. 225-227, 2009.

AZIZI-MALEKABADI, H.; HOSSEINI, M.; POURGANJI, M. et al. Deletion of ovarian hormone induces a sickness behavior in rats comparable to the effect of lipopolysaccharide. **Neurol Res Int.** 2015.

BAI, F.; LI, X.; CLAY, M. et al. Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". **Pharmacol Biochem Behav.** v. 70, n. 2-3, p.187-92, 2001.

BALABAN, H.; NAZIROĞLU, M.; DEMIRCI, K. et al. The Protective Role of Selenium on Scopolamine-Induced Memory Impairment, Oxidative Stress, and Apoptosis in Aged Rats: The Involvement of TRPM2 and TRPV1. **Channels Mol Neurobiol.** 2016. No prelo.

BANASIKOWSKI, T.J.; CLOUTIER, C.J.; OSSENKOPPB, K-P. et al. Repeated exposure of male mice to low doses of lipopolysaccharide: Dose and time dependent development of behavioral sensitization and tolerance in an automated light–dark anxiety test. **Behav Brain Res.** v. 286, p. 241–248, 2015

BANKS, W.A.; ERICKSON, M.A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. **Neurobiol Dis.** v. 37, p. 26–32, 2010.

BARTLETT, D.J.; TENNEY, S.M. Control of breathing in experimental anemia. **Respir Physiol.** v. 10, n. 3, p. 384-395, 1970.

BARTON, G.M.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor signaling pathways. **Science.** v. 300, p. 1524–1525, 2003.

BATES, J.T. **Lung mechanics: An inverse modeling approach.** Cambridge: Cambridge, 2009, Universty Press.

BATES, J. H. T.; LAUZON, A.-M.; DECHMAN, G. S. et al. Temporal dynamics of pulmonary response to intravenous histamine in dogs: effects of dose and lung volume. **J Appl Physiol.** v. 76, p. 616–626, 1994.

BATES, J. H. T.; RINCON, M.; IRVIN, C. G. Animal models of asthma. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,** v. 297, p. L401-L410, 2009.

BATISTA, P.A.; FOGAÇA, M.V.; GUIMARÃES, F.S. The endocannabinoid, endovanilloid and nitregic systems could interact in the rat dorsolateral periaqueductal gray matter to control anxiety-like behaviors. **Behav Brain Res.** v. 15, n. 293, p. 182-188, 2015.

BEM-SHAUL, V.; SOFER, Y.; BERGMAN, M. et al. Lipopolysaccharide induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit. **Shock.** v. 12, n. 4, p. 288-293, 1999.

BENNION, D.; JENSEN, T.; WALTHER, C. et al. Transient receptor potential vanilloid 1 agonists modulate hippocampal CA1 LTP via the GABAergic system. **Neuropharmacology.** v. 61, p. 730–738, 2011.

BENSON, S.; ENGLER, H.; SCHEDLOWSKI, M. et al. Experimental endotoxemia as a model to study neuroimmune mechanisms in human visceral pain. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1262, p.108-117, 2012

BERNARD, C.E.; DAHLBY, R.; HOENER, B. An isolated perfused lung model with real time data collection and analysis of lung function. **J Pharmacol Toxicol Methods.** v. 38, n.1, p. 41-46, 1997.

BERNARD, G. R. Acute distress syndrome: a historical perspective. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 172, p. 798-806, 2005.

BERNARDI, M.M.; DE SOUZA, H.; PALERMO-NETO, J. Effects of Single and Long-Term Haloperidol Administration on Open Field Behavior of Rats. **Psychopharmacology.** v.73, p.171 – 175, 1981.

BEVAN, S; ANDERSSON, D. A. TRP channel antagonists for pain-opportunities beyond TRPV1. **Curr Opin Investig Drugs.** v. 10, n. 7, p. 655- 663, 2009.

BEVAN, I.S.; HOTH, S.; HUGHES, G. et al. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. **Br J Pharmacol.** v.107, p. 544-552, 1992.

BHATIA, M.; ZHI, L.; ZHANG, H. et al. Role of substance P in hydrogen sulfide-induced pulmonary inflammation in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 291, p. L896-L904, 2006.

BIRRELL, M.A.; BONVINI, S.J.; DUBUIS, E. et al. Tiotropium modulates transient receptor potential V1 (TRPV1) in airway sensory nerves: A beneficial off-target effect? **J Allergy Clin Immunol.** v. 133, n. 3, p. 679–687, 2014.

BISHNOI, M.; PREMKUMAR, L.S. Possible consequences of blocking transient receptor potential vanilloid. **Curr Pharm Biotechnol.** v. 12, n. 1, p. 102-114, 2011.

BLACKWELL, T.S.; CHRISTMAN, J.W. Sepsis and cytokines: current status. **Br J Anaesth.** v. 77, n. 1, p. 110-117, 1996.

BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacol Ther.** v. 111, n. 1, p. 194-223, 2006.

BLUTHE, R.M.; MICHAUD, B.; KELLEY, K.W. et al. Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. **Neuroreport.** v. 7, p. 2823–2827, 1996

BLUTHÉ, R.M.; WALTER, V.; PARNET, P. et al. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. **C R Acad Sci III.** v. 317, p. 499–503, 1994

BONE, R.C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med.** v. 115, p. 457-69, 1991.

BOURIN, M.; CHENU, F.; RIPOLL, N. et al. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced-swim and tail suspension tests. **Behav Brain Res.** v. 164, n. 2, p. 266-269, 2005.

BUENO, A.C.; SEAHORN, T.L.; CORNICK-SEAHORN, J. et al. Plasma and urine nitric oxide concentrations in horses given below a low dose of endotoxin. **Am J Vet Res.** v. 60, n. 8, p. 969-976, 1999.

CABRAL, L.D.M.; GIUSTI-PAIVA, A. The Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) antagonist capsaizepine improves the impaired lung mechanics during endotoxemia. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 2016. No prelo.

CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.L.; FERREIRA, A.E. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Therap.** v. 106, p. 179-208, 2005.

CARVALHO, A. R.; ZIN, W. A. Respiratory system dynamical mechanical properties: modeling in time and frequency domain. **Biophysical Reviews**, v. 3, p. 71-84, 2011.

CASAROTTO, P.C.; TERZIAN, A.L.; AGUIAR, D.C. et al. Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB(1)) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. **Neuropsychopharmacology**. v.37, p. 478–486, 2012.

CATERINA, M.J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 292, n. 1, p. R64-R76, 2007.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. v.389, n.6653, p.816-24. 1997.

CHATTERJEE, M.; JAISWAL, M.; PALIT, G. Comparative evaluation of forced swim test and tail suspension test as models of negative symptom of schizophrenia in rodents. **ISRN Psychiatry**. v. 12; p. 595141, 2012.

CHAVEZ, A.E.; CHIU, C.Q.; CASTILLO, P.E. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. **Nat Neurosci**. v. 13, p. 1511–1518, 2010.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 25, n. 3, p. 235-260, 2001.

CHOOWANTHANAPAKORN, M.; LU, K.W.; YANG, J., et al. Targeting TRPV1 for body weight control using TRPV1(-/-) mice and electroacupuncture. **Sci Rep**. v. 5, p. 17366, 2015.

CHOPRA, M., REUBEN, J.S.; SHARMA, A.C. Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms. **Exp Biol Med**. v. 234, p. 361–371, 2009.

CHROUSOS, G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis and immune-mediated inflammation. **NEJM**. v.332, p.1351-1362, 1995

CIOFFI, D.L.; LOWE, K.; ALVAREZ, D.F. et al. TRPV1 on the lung endothelium: calcium channels that regulate barrier function. **Antioxid Redox Signal**. v. 11, n. 4, p. 765-776, 2009

CLARK, N.; KEEBLE, J.; FERNANDES, E.S. et al. The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor protects against the onset of sepsis after endotoxin. **FASEB J.** v. 21, n. 13, p. 3747-55, 2007.

CLEMENT, J.G.; MILLS, P.; BROCKWAY, B. Use of telemetry to record body temperature and activity in mice. **J Pharmacol Methods.** v.21, n. 2, p. 129-140, 1989.

CLOOTS, R.H.; SANKARANARAYANAN, S.; DE THEIJE, C.C. et al. Ablation of Arg1 in hematopoietic cells improves respiratory function of lung parenchyma, but not that of larger airways or inflammation in asthmatic mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 305, n.5, p. L364-L376, 2013.

CRAWLEY, J., GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.** n. 13, p. 167-1670, 1980.

CRISTINO, L.; DE PETROCELLIS, L.; PRYCE, G. et al. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. **Neuroscience.** v. 139, n. 4, p. 1405-1415, 2006.

CRYAN, J.F.; PAGE, M.E.; LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. **Eur J Pharmacol.** v. 436, n. 3, p. 197-205, 2002.

DANG, H.; CHEN, Y.; LIU, X. et al. Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v.33, p. 1417–1424, 2009.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **Eur J Pharmacol.** v. 500, p.399– 411, 2004.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immun Allerg Clin North Am.** v. 29, n. 2, p. 247–264, 2009.

DAVID, D.J.P.; DHONNCHADHA, B.A.N.; JOLLIET, P. et al. Are there gender differences in the temperature profile of mice after acute antidepressant administration and exposure to two animal models of depression? **Behav Brain Res.** v. 119, n. 2, p. 203–211, 2001.

DELESCLUSE, I.; MACE, H.; ADCOCK, J.J. Inhibition of airway hyper-responsiveness by TRPV1 antagonists (SB-705498 and PF-04065463) in the unanaesthetized, ovalbumin-sensitized guinea pig. **Br J Pharmacol.** v. 166, n.6, p. 1822-1832, 2012.

DE LOGU, F.; PATACCHINI, R.; FONTANA, G. et al. TRP functions in the broncho-pulmonary system. **Semin Immunopathol.** 2016. No prelo.

DE MAGALHÃES SIMOES, S.; DOS SANTOS, M.A.; DA SILVA OLIVEIRA, M. et al. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. **Clin Exp Allergy.** v. 35, n. 5, p. 602-611, 2005.

DEUSSING, J.M. Animal models of depression. **Drug Discov Today: Dis Model.** v. 3, n. 4, p. 375–383, 2006

DERBENEV, A.V.; MONROE, M.J.; GLATZER, N.R. et al. Vanilloid mediated heterosynaptic facilitation of inhibitory synaptic input to neurons of the rat dorsal motor nucleus of the vagus. **J Neurosci.** v. 26, p. 9666–9672, 2006.

DERBENEV, A.V.; SMITH, B.N. Dexamethasone rapidly increases GABA release in the dorsal motor nucleus of the vagus via retrograde messenger-mediated enhancement of TRPV1 activity. **PLoS One.** v.8, p. e70505, 2013.

DEVESA, I.; PLANELLS-CASES, R.; FERNÁNDEZ-BALLESTER, G. et al. Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis. **J Inflamm Res.** v. 4, p. 67-81, 2011.

DINARELLO C.A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **J Endotoxin Res.** v. 10, p. 201–222, 2004.

DORAS, C.; LE GUEN, M.; PETÁK, F. et al. Cardiorespiratory effects of recruitment maneuvers and positive end expiratory pressure in an experimental context of acute lung injury and pulmonary hypertension. **BMC Pulm Med.**v. 15, p. 82, 2015.

DOCHERTY, R.J.; YEATS, J.C.; PIPER, A.S. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. **Br J Pharmacol.** v. 121, p. 1461–1467, 1997.

DUMAN, C.H. Models of depression **Vitam Horm.** v. 82, p. 1–21, 2010.

- EK, M.; KUROSAWA, M.; LUNDEBERG, T. et al. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. **J Neurosci.** v. 18, p. 9471–9479, 1998.
- ENGBLOM, D.; ANDERSSON, I.M.; SAHA, S. et al. Induction of microsomal prostaglandin E synthase in the brain endothelium and parenchyma in adjuvant-induced arthritis. **J Comp Neurol.** v. 452, p.205-2014, 2012.
- FAN-XIN, M.; LI-MEI, S.; BEI, S. et al. Heat shock factor 1 regulates the expression of the TRPV1 gene in the rat preoptic-anterior hypothalamus area during lipopolysaccharide-induced fever. **Exp Physiol.** v.97, n. 6, p. 730-740, 2012
- FEINMARK, S.J.; BEGUM, R.; TSVETKOV, E. et al. 12-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid mediate metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression at hippocampal CA3-CA1 synapses. **J Neurosci.** v. 23, p. 11427–11435, 2003.
- FERNANDES, E.S.; LIANG, L.; SMILLIE, S.J. et al. TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome. **J Immunol.** v. 188, n. 11, p. 5741-5751, 2012.
- FLESHNER, M., GOEHLER, L.E., HERMANN, J. et al. Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. **Brain Res Bull.** v.37, p. 605– 610, 1995.
- FORONJY, R.F.; MIROCHNITCHENKO, O.; PROPOKENKO, O. et al. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 173, n. 6, p. 623-631, 2006.
- FREDBERG, J.J.; BUNK, D.; INGENITO, E. et al. Tissue resistance and the contractile state of the lung parenchyma. **J Appl Physiol.** v. 74, p. 1387–1397, 1993.
- GARAMI, A.; SHIMANSKY, Y.P.; PAKAI, E.; Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. **J Neurosci.** v. 30, n. 4, p. 1435-1440, 2010.
- GATTINONI, L.; PELOSI, P.; SUTER, P.M. et al. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 158, p. 3-11, 1998.

GAVVA, N.R. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. **Trends Pharmacol Sci.** v. 29, n. 11, p. 550-557, 2008.

GEPPETTI, P.; MATERAZZI, S.; NICOLETTI, P. The transient receptor potential vanilloid 1: Role in airway inflammation and disease. **Eur Jour of Pharmacol.** v. 533, p. 207–214, 2006.

GIBSON, H.E.; EDWARDS, J.G.; PAGE, R.S. et al. TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. **Neuron.** v. 57, p. 746–759, 2008.

GLAUSER, M.P. Pathophysiologic basis of sepsis: considerations for future strategies of intervention. **Crit Care Med.** v. 8, n. 9, p. 54-58, 2000.

GONZALEZ-REYES, L.E.; LADAS, T.P.; CHIANG, C-C. et al. TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced epileptiform activity *in vitro* and electrographic seizures *in vivo* **Exp Neurol.** v. 250, p. 321–332, 2013.

GRACE, M.S.; BAXTER, M.; DUBUIS, E. et al. Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. **Br J Pharmacol.** v.171, n. 10, p. 2593-2607, 2014.

GRANGER, J.I.; RATTI, P.L.; SATTA, S.C. et al. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. **Psychoneuroendocrinology.** v. 38, n. 7, p. 1047–1057, 2013.

GRONEBERG, D.A.; NIIMI, A.; DINH, Q.T. et al. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 170, p. 1276-1280, 2004.

GRUETER, B.A.; BRASNJO, G.; MALENKA, R.C. Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. **Nat Neurosci.** v. 13, p. 1519–1525, 2010.

GUPTILL, V.; CUI, X.; KHAIBULLINA, A. et al. Disruption of the transient receptor potential vanilloid can affect survival, bacterial clearance, and cytokine gene expression during murine sepsis. **Anesthesiology.** v. 114, p.1190–1199, 2011.

HAKIMIZADEH, E.; ORYAN, S.; HAJIZADEH MOGHADDAM, A. et al. Endocannabinoid System and TRPV1 Receptors in the Dorsal Hippocampus of the Rats Modulate Anxiety-like Behaviors. **Iran J Basic Med Sci.** v. 15, n.3, p. 795-802, 2012.

HAMAKAWA, H.; BARTOLÁK-SUKI, E.; PARAMESWARAN, H. et al. Structure-function relations in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v. 45, p. 517-524, 2010.

HANTOS, Z. DARÓCZY, B.; SUKI, B. et al. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. **J Appl Physiol.** v. 72, p. 168–178, 1992.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuros Biobehav Rev.** v. 12, p. 123 – 137, 1988

HAUGER, R.L.; RISBROUGH, V.; OAKLEY, R.H. et al. Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1179, p. 120–143, 2009

HAYASE, T. Differential effects of TRPV1 receptor ligands against nicotine-induced depression-like behaviors. **BMC Pharmacol.** v. 11, p. 6, 2011.

HELYES, Z.; ELEKES, K.; NÉMETH, J. et al. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 292, n. 5, p. L1173-L1181, 2007.

HEROLD, S.; GABRIELLI, N.M.; VADÁSZ, I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,** v. 305, p. L665-L681, 2013.

HEUMANN, D.; ROGER, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. **Clin Chim Acta.** v. 323, p. 59–72, 2002.

HINSHAW, L.B.; EMERSON Jr, T.E.; TAYLOR Jr, F.B. et al. Lethal *Staphylococcus aureus* induced shock in primates: prevention of death with anti-TNF antibody. **J Trauma.** v. 33, n. 4, p. 568-573, 1992.

HIZUME, D.C.; TOLEDO, A.C.; MORIYA, H.T. et al. Cigarette smoke dissociates inflammation and lung remodeling in OVA-sensitized and challenged mice. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 181, n. 2, p.167-76, 2012.

HOFF, Z. Methods of blood collection in mouse. **Lab Anim Tech.** v. 29, n.10, p. 47-53, 2000.

HUANG, W.X.; YU, F.; SANCHEZ, R. et al. TRPV1 promotes repetitive febrile seizures by pro-inflammatory cytokines in immature brain. **Brain Behav Immun.** 2015. in press.

IIDA, T.; SHIMIZU, I.; NEALEN, M.L. et al. Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. **Neurosci Lett.** v. 378, n. 1, p. 28-33, 2005.

ITO, S.; INGENITO, E.P.; BREWER, K.K. et al. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. **J Appl Physiol.** v. 98, p. 503-511, 2005.

JANDA, S.; YOUNG, A.; FITZGERALD, J. M. et al. The effect of stains on mortality from severe infections and sepsis: A systematic review and meta-analysis. **J Crit Care.** v. 25, p. 656.e7-656.e22, 2010.

JIA, Y.; LEE, L.Y. Role of TRPV receptors in respiratory diseases. **Biochim Biophys Acta.** v. 1772, p. 915-927, 2007.

KANEKO, Y.; SZALLASI, A. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. **Br J Pharmacol.** v. 171, n.10, p. 2474-2507, 2014.

KARAKAYA, B.; TOMBAK, A.; SERIN, M.S. et al. Change in plasma a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type-1 repeats-13 and von Willebrand factor levels in venous thromboembolic patients. **Hematology.**2016. No prelo.

KARIMA, R.; MATSUMOTO, S.; HIGASHI, H. et al. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. **Mol Med Today.**v.5, p. 123-32, 1999

KASCKOW, J.W.; MULCHAHEYB, J.J.; GERACIOTI JR, T.D. Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. **Prog Neuro-Psychopharm Biol Psych.** v. 28, p. 291 – 295, 2004.

KATZENSTEIN, A. L.; BLOOR, C. M.; LEIBOW, A. A. Diffuse alveolar damage: the role of oxygen, shock, and related factors. **Am J Pathol,** v. 85, p. 209-228, 1976.

KAUER, J.A.; GIBSON, H.E. Hot flash: TRPV channels in the brain. **Trends Neurosci.** v. 32, p. 215–224, 2009.

KEEBLE, J., RUSSELL, F., CURTIS, B., et al. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in the vascular and hyperalgesic components of joint inflammation. **Arth Rheum.** v. 52, p. 3248-3256, 2005.

KELMER, G. Update on treatments for endotoxemia. **Vet Clin Nort Am.** v. 25, p. 259-270, 2009.

KENTISH, S.J.; FRISBY, C.L.; KRITAS, S. et al. TRPV1 Channels and gastric vagal afferent signalling in lean and high fat diet induced obese mice. **PLoS One.** v.10, n. 8, 2015.

KIRSTEN, T.B.; GALVÃO, M.C.; REIS-SILVA, T.M. et al. Zinc Prevents Sickness Behavior Induced by Lipopolysaccharides after a Stress Challenge in Rats. **PLoS ONE.** v. 10, n.3, 2015.

KLUGER, M.J. Is fever beneficial? **Yale J biol med,** v. 59, p. 89-95, 1986

KOHRO, S.; IMAIZUMI, H.; YAMAKAGE, M. et al. Reductions in levels of bacterial superantigens/cannabinoids by plasma exchange in a patient with severe toxic shock syndrome. **Anaesth Int Care.** v. 32, n. 4, p. 588-591, 2004.

KONSMAN, J.P.; LUHESHI, G.N.; BLUTHÉ, R.M. et al. The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. **Eur J Neurosci.** v. 12, p. 4434–4446, 2000.

KONSMAN, J.P.; VIGUES, S.; MACKERLOVA, L. et al. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: Relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. **J Comp Neurol.** v. 472, n. 1, p. 113–129, 2004

KONSMAN, J.P.; VEENEMAN, J.; COMBE, C. et al. Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. **Eur J Neurosci.** v. 28, n. 12, p. 2499-2510, 2008

KOSOUR, C. GUEDES, C.A.V.; DRAGOSAVAC, D. et al. Síndrome de desconforto respiratório agudo. In: DRAGOSAVAC, D.; ARAÚJO, S. **Protocolos de condutas em terapia intensiva.** Rio de Janeiro: Atheneu, 2014. cap. 50, p. 471-482.

LAÍNEZ, S.; VALENTE, P.; ONTORIA-OVIEDO, I. et al. GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. **FASEB J.** v. 24, n. 6, p. 1958-1970, 2010.

LANÇAS, T.; KASAHARA, D.I.; PRADO, C.M. et al. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. **J Appl Physiol.** v. 100, n. 5, p. 1610-1616, 2006.

LASSELIN, J.; ELSENBRUCH, S.; LEKANDER, M. et al. Mood disturbance during experimental endotoxemia: Predictors of state anxiety as a psychological component of sickness behavior. **Brain Behav Immun.** 2016. No prelo.

LEE, E.; JUNG, D.Y.; KIM, J.H. et al. Transient receptor potential vanilloid type-1 channel regulates diet-induced obesity, insulin resistance, and leptin resistance. **FASEB J.** v.29, n.8, p.3182-3192, 2015

LEHTO, S.G.; TAMIR, R.; DENG, H. et al. Antihyperalgesic effects of (R,E)-N-(2-hydroxy-2,3-dihydro-1Hinden-4-yl)-3-(2-(piperidin-1-yl)-4-(trifluoromethyl)phenyl)-acrylamide (AMG8562), a novel transient receptor potential vanilloid type 1 modulator that does not cause hyperthermia in rats. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 326, n. 1, p. 218-229, 2008

LEMOS, J. I.; RESSTEL, L.B.; GUIMARÃES, F.S. Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. **Behav Brain Res.** v. 207, n. 1, p. 105-111, 2010.

LEON, L. R.; KOZAK, W.; PESCHON, J. et al. Exacerbated febrile responses to LPS, but not turpentine, in TNF double receptor-knockout mice. **Am J Physiol.** v. 272, p. R563-R569, 1997.

LEVY, M.M.; FINK, M.P.; MARSHALL, J.C. et al. 2001. CCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med.** v. 31, p. 1250-1256, 2003.

LI, H.B.; MAO, R.R.; ZHANG, J.C. et al. Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. **Biol Psychiatry.** v. 64, p. 286–292, 2008.

LI, R.; ZHAOA, D.; QU, R. et al. The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuros Letters.** v. 594, p. 17–22, 2015.

LI, X.; ZHANG, X.; YANG, E. et al. Fish oil-supplemented parenteral nutrition could alleviate acute lung injury, modulate immunity, and reduce inflammation in rats with abdominal sepsis. **Nutrit Res.** v. 35, n. 9, p.784–791, 2015.

LIN, W.C.; CHEN, C.W.; HUANG, Y.W. et al. Kallistatin protects against sepsis-related acute lung injury via inhibiting inflammation and apoptosis. **Sci Rep.** v. 5, p. 12463, 2015.

LISBOA, S.F.; MAGESTO, A.C.; AGUIAR, J.C. et al. Complex interaction between anandamide and the nitrenergic system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. **Neuropharmacology.** v. 75C, p. 86–94, 2013.

LINO-DE-OLIVEIRA, C.; DE LIMA, T.C.; DE PADUA CAROBREZ, A. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. **Beh Brain Res,** v.158, n.2, p.243-50, 2005.

LIU, G.X.; CAI, G.Q.; CAI, Y.Q. et al. Reduced Anxiety and Depression-Like Behaviors in Mice Lacking GABA Transporter Subtype 1. **Neuropsychopharm.** v. 32, p. 1531–1539, 2007.

LIU, L.; SIMON, S.A. Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. **Neurosci Lett.** v.228, p.29–32, 1997.

LIU, X.; GERSHENFELD, H.K. Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice. **Biol Psychiatry.** v. 49, n. 7, p. 575-81, 2001.

LONG, N.C.; MORIMOTO, A.; NAKAMORI, T. et al. Systemic injection of TNF-alpha attenuates fever due to IL-1 beta and LPS in rats. **Am J Physiol.** v. 263, p. R987-R991, 1992.

LOWE, K.; ALVAREZ, D.; KING, J. et al. Phenotypic heterogeneity in lung capillary and extra-alveolar endothelial cells. Increased extra-alveolar endothelial permeability is sufficient to decrease compliance. **J Surg Res.** v. 143, n. 1, p. 70-77, 2007.

LOWE, K.; ALVAREZ, D.F.; KING, J.A. et al. Perivascular fluid cuffs decrease lung compliance by increasing tissue resistance. **Crit Care Med.** v. 38, n. 6, p. 1458-1466, 2010.

LOWIN, T.; APITZ, M.; ANDERS, S. et al. Anti-inflammatory effects of N-acylethanolamines in rheumatoid arthritis synovial cells are mediated by **TRPV1** and TRPA1 in a COX-2 dependent manner. **Arthritis Res Ther.** v.17, p. 321, 2015.

LUTCHEN, K.R.; HANTOS, Z.; PETÁK, F. et al. Airway inhomogeneities contribute to apparent lung tissue mechanics during constriction. **J Appl Physio.** v. 80, p. 1841– 1849, 1996.

MACARTHUR, H.; WESTFALL, T.C.; RILEY, D.P.; et al. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 97, n. 17, p. 9753-9758, 2000.

MAGGI, C.A.; BEVAN, S.; WALPOLE, C.S.J. et al. A comparison of capsazepine and ruthenium red as capsaicin antagonists in the rat isolated urinary bladder and vas deferens **Br J Pharmacol** . v. 108, p. 801-805, 1993.

MAI, S.; KHAN, M.; LIAW, P. et al. **Experimental Sepsis Models, Sepsis - An Ongoing and Significant Challenge**, Prof. Luciano Azevedo (Ed.), InTech, 2012.

MANNA, S.S.; UMATHE, S.N. Transient receptor potential vanilloid 1 channels modulate the anxiolytic effect of diazepam. **Brain Res.** v. 1425, p. 75-82, 2012.

MARINELLI, S.; VAUGHAN, C.W.; CHRISTIE, M.J. et al. Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. **J Physiol.** v. 543, n. 2, p. 531-540, 2002.

MARSCH, R.; FOELLER, E.; RAMMES, G. et al. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. **J Neurosci.** v. 27, n.4, p. 832-839, 2007.

MARTIN, G.S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v.10, n.6, p.701–706, 2013

MATTHAY, M.A.; ZEMANS, R.L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. **Annu Rev Pathol.** v. 6, p. 147–163, 2011.

McCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infections influences behavior. **J Exp Biol.** v. 216, p. 84-98, 2013.

MEDURI, G. U.; KOHLER, G.; HEADLEY, S. et al. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. **Chest.** v. 108, p. 1303–1314, 1995.

MEZEY, E.; TOTH, Z.E.; CORTRIGHT, D.N. et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 97, n. 7, p. 3655-3660, 2000.

MICALE, V.; CRISTINO, L.; TAMBURELLA, A. et al. Anxiolytic Effects in Mice of a Dual Blocker of Fatty Acid Amide Hydrolase and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channels. **Neuropsychopharmacology**. v.34, n. 3, p. 593-606, 2009.

MILLS, C.; McMACKIN, M.; JAFFE, R. et al. Effects of the transient receptor potential vanilloid 1 antagonist A-425619 on body temperature and thermoregulation in the rat. **Neuroscience**. v. 156, p. 165–174, 2008.

MIN, H.; LEE, H.; LIM, H. et al. TLR4 enhances histamine-mediated pruritus by potentiating TRPV1 activity. **Mol Brain**. v. 7, p. 59, 2014.

MITAKA, C.; HIRATA, Y.; YOKOYAMA, K. et al. Beneficial effect of carboxy PTIO on hemodynamic and blood gas changes in septic shock dogs. **Crit Care**. v. 1, n. 1, p. 45–50, 1997.

MOLTZ, H. Fever: causes and consequences. **Neurosc BioBehav Rev**. v. 17, p. 237-269, 1993.

MORAES, T. J.; ZURAWSKA, J. H.; DOWNEY, G. P. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. **Curr Opin Hematol**, v. 13, p. 21–27, 2006.

MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D.C.; TERZIAN, A.L. et al. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? **Neuroscience**. v. 204, p. 186-192, 2012.

MORTOLA, J.P.; FRAPPELL, P.B. On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. **Can J Physiol Pharmacol**. v. 76, n. 10-11, p. 937-44, 1998.

NAMAS, R.; ZAMORA, R.; NAMAS, R. et al. Sepsis: Something old, something new, and a systems view. **J Crit Care**. v. 27, p. 314-11, 2012.

NGUYEN, T.L. ; NAM, Y.-S.; LEE, S.Y. et al. Effects of capsazepine, a transient receptor potential vanilloid type 1 antagonist, on morphine-induced antinociception, tolerance, and dependence in mice. **Brit J Anaesth**. v. 105, p. 5, p. 668–74, 2010.

NEDUNGADI, T.P.; CARREÑO, F.R.; WALCH, J.D. et al. Region-specific changes in transient receptor potential vanilloid channel expression in the vasopressin magnocellular system in hepatic cirrhosis-induced hyponatraemia. **J Neuroendocrinol.** v. 24, p. 642–652, 2012.

NILIUS, B.; OWSIANIK, G.; VOETS, T. et al. Transient receptor potential cation channels in disease. **Physiol Rev.** v. 87, n. 1, p.165-217, 2007.

NISHIO, K.; HORIE, M.; AKAZAWA, Y. et al. Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. **Red Biol.** v. 1, p. 97-103, 2013.

OHMURA, Y.; YOSHIOKA, M. The roles of corticotropin releasing factor (CRF) in responses to emotional stress: is CRF release a cause or result of fear/anxiety? **CNS Neurol Disord Drug Targets.** v.8, p. 459–469, 2009

ORLIAC, M.L.; PERONI, R.N.; ABRAMOFF, T. et al. Increases in vanilloid TRPV1 receptor protein and CGRP content during endotoxemia in rats. **Eur J Pharmacol.** v. 566, n.1-3, p.145-52, 2007.

OSUCHOWSKI, M.F.; WELCH, K.; SIDDIQUI, J. et al. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. **J Immunol.** v. 177, p. 1967-74, 2006.

PARRILLO, J.E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med.** v. 328, n. 20, p. 1471-1477, 1993.

PATEL, K.N.; SOUBRA, S.H.; LAM, F.W. et al. Polymicrobial sepsis and endotoxemia promote microvascular thrombosis via distinct mechanisms. **J Thromb Haemost.** v.8, n. 6, p. 1403–1409, 2010

PEREIRA JUNIOR, G.A.; MARSON, F.; ABEID, M. et al. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina, Ribeirão Preto.** v.31, p. 349-362. 1998.

PETERS, J.H.; MCDOUGALL, S.J.; FAWLEY, J.A. et al. Primary afferent activation of thermosensitive TRPV1 triggers asynchronous glutamate release at central neurons. **Neuron** 65. p. 657–669, 2010.

PINTO, T. S. **Avaliação de diferentes métodos para o estudo da mecânica respiratória em um modelo murino de enfisema pulmonar.** 2008, 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacod Ther.** v. 229, n. 2; p. 327-336, 1977.

PORSOLT, R.D.; DENIEL, M.; JALFRE, M. Forced swimming in rats; hypothermia, immobility and the effects of imipramine. **Eur J Pharmacol.** v. 57, p. 431-436, 1979.

PUGIN, J.; VERGHESE, G.; WIDMER, M.C. et al. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med,** v. 27, p. 304-312, 1999.

PULTRINI, A.M.; GALINDO, L.A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences.** v. 78, p. 1720-1725, 2006.

QUINTEL, M.; PELOSI, P.; CAIRONI, P. et al. An increase of abdominal pressure increases pulmonary edema in oleic acid-induced lung injury. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 169, p. 534-541, 2004.

RANDALL, M.D.; HARRIS, D.; KENDALL, D.A. et al. Cardiovascular effects of cannabinoids. **Pharmacol Ther.** v. 95, n. 2, p. 191-202, 2002.

RANIERI, V.M.; RUBENFELD, G.D.; THOMPSON, B.T. et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. ARDS Definition Task Force. **JAMA.** v. 307, n. 23, p. 2526-2533, 2012.

RAWLS, S.M.; BENAMAR, K. Opioid, cannabinoid, and transient receptor potential (TRP) systems: effects on body temperature. **Front Biosci (Schol Ed).** v. 3, p. 822-845, 2014.

REISS, L.K.; UHLIG, U.; UHLIG, S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. **Eur J Cell Biol.** v. 91, n.6-7, p. 590-601, 2012.

RENARD, C.E.; DAILLY, E.; DAVID, D.J. et al. Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 17, n. 4, p. 449-55, 2003.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nat Rev Immunol**, v. 8, p. 776-787, 2008.

ROMANOVSKY, A.A. Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. **Auton Neurosci**. v.85, n. 1-3, p. 39-48, 2000.

ROMANOVSKY, A.A.; ALMEIDA, M.C.; GARAMI, A. et al. The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. **Pharmacol Rev**. v. 61, p. 228–261, 2009.

ROMANOVSKY, A.A.; KULCHITSKY, V.A.; AKULICH, N.V. et al. First and second phases of biphasic fever: two sequential stages of the sickness syndrome? **Am J Physiol**. v.271, p. R244-R253, 1996.

ROSAS-BALLINA, M.; VALDÉS-FERRER, S.I.; DANCHO, M.E. et al. Xanomeline suppresses excessive pro-inflammatory cytokine responses through neural signal-mediated pathways and improves survival in lethal inflammation. **Brain Behav Immun**. v. 44, p. 19-27, 2015.

ROSENFELD, Y.; PAPO, N.; SHAI, Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. **J Biol Chem**. v. 281, n. 3, p. 1636-1643, 2006.

ROSSAINT, J.; ZARBOCK, A. Pathogenesis of Multiple Organ Failure in Sepsis. **Crit Rev Immunol**. v. 35, n. 4, p. 277-991, 2015.

RUBIN, A.S. et al. Hiper- responsividade brônquica. **J Bras Pneumol**. v. 28, p. S101-S121, 2002.

RUBINO, T.; REALINI, N.; CASTIGLIONI, C. et al. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. **Cereb Cortex**. v. 18, p. 1292–1301, 2008.

RYSKAMP, D.A.; REDMON, S.; JO, A.O. et al. TRPV1 and Endocannabinoids: Emerging Molecular Signals that Modulate Mammalian Vision. **Cells**. v. 3, n. 3, p. 914–938, 2014.

SADOWITZ, B.; ROY, S.; GATTO, L.A. et al. Lung injury induced by sepsis: lessons learned from large animal models and future directions for treatment. **Expert Rev Anti Infect Ther**. v. 9, n. 12, p. 1169-1178, 2011.

- SAND, C.A.; STARR, A.; NANDI, M. et al. Blockade or deletion of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is not protective in a murine model of sepsis. **F1000 Res.** v. 4, p. 93, 2015.
- SANTOS, L.M.O.; CERVILHA, D.A.B; CABRAL, L.D.M. et al. Bronchial responsiveness in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 194, p. 9-14, 2014.
- SAPER, C.B.; BREDER, C.D. The neurologic basis of fever. **N Eng J Med.** v. 330, p. 1880-1886, 1994.
- SATOH, H.; LOU, Y.P.; LUNDBERG, J. M. Inhibitory effects of capsazepine and SR 48968 on citric acid-induced bronchoconstriction in guinea-pigs. **Eur J Pharmacol.** v. 236, n. 3, p. 367–372, 1993.
- SCHWARTZ, E.S.; CHRISTIANSON, J.A.; CHEN, X. et al. Synergistic Role of TRPV1 and TRPA1 in Pancreatic Pain and Inflammation. **Gastroenterology.** v. 140, n.4, p. 1283–1291, 2011.
- SHALABY, K.H.; GOLD, L.G.; SCHUESSLER, T.F. et al. Combined forced oscillation and forced expiration measurements in mice for the assessment of airway hyperresponsiveness. **Respir Res.** v. 11, p. 82, 2010.
- SHARSHAR, T.; ANNANE, D.; GRANDMAISON, G. et al. The neuropathology of septic shock. **Brain Pathology.** v. 14, p. 21-33, 2004.
- SHOUDAI, K.; PETERS, J.H.; MCDOUGALL, S.J. et al. Thermally active TRPV1 tonically drives central spontaneous glutamate release. **J Neurosci.** v. 30, n. 14, p. 470 –14,475, 2010.
- SILVA, E.; PEDRO, M.A.P.; SOGAYAR, A.C.B et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care.** v. 8, n. 4, p. 251-260, 2004.
- SILVA, V.C.; GIUSTI-PAIVA, A. sickness behavior is delayed in hypothyroid mice, **Brain Behav and Imm.** v. 45, p. 109-117, 2015.
- SIMON, P., DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behav Brain Res.** v. 61, p. 59-64, 1994.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A.P.; LIMA, L.C. et al. Sepsis: an update. **Rev Bras Ter Intensiva**. v. 23, n. 2, p. 207-216, 2011.

SONCINI, R.; DE SOUZA, D.F.; NEVES, A.P. et al. Dipyrone attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neurosci Lett**. v. 516, n. 1, p. 114-118, 2012.

SPITZER, J.A. Animal models of endotoxemia and sepsis. In **Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ Failure**, ed. Schlag G & Redl H, p. 1108–1118. Springer-Verlag, Berlin, 1993.

STAROWICZ, K.; MAIONE, S.; CRISTINO, L. et al. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. **J Neurosci**. v. 27, n. 50, p. 13739-13749, 2007.

STEINBERG, K.P.; MILBERG, J.A.; MARTIN, T.R. et al. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome: prognostic indicators. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 150, p. 113-122, 1998.

STEINBERG, K. P.; HUDSON, L. D. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. The clinical syndrome. **Clin Chest Med**, v. 21, p. 401-417, 2000.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B. et al. The Tail Suspension Test: a New Method for Screening Antidepressants in Mice. **Psychopharm**. v. 85, p. 367–370, 1985.

SUDBURY, J.; BOURQUE, C.W. Dynamic and Permissive Roles of TRPV1 and TRPV4 Channels for Thermosensation in Mouse Supraoptic Magnocellular Neurosecretory Neurons. **J Neurosci**. v. 33, n.43, p. 17160-17165, 2013.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev**. v. 51, n.2, p.159-212. 1999.

SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D.N.; BLUM, C.A. et al. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat Rev Drug Discov**. v. 6, n.5, 357-372, 2007.

TANG, L.; BAI, J.; CHUNG, C.S. et al. Active players in resolution of shock/sepsis induced indirect lung injury: immunomodulatory effects of Tregs and PD-1. **J Leukoc Biol**. v. 96, n.5, p. 809-820, 2014.

TERZIAN, A.L.; AGUIAR, D.C.; GUIMARAES, F.S. et al. Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. **Eur Neuropsychopharmacol.** v. 19, n.3, p. 188-195, 2009.

THIERRY, B.; STÉRU, L.; SIMON, P. et al. The tail suspension test: ethical considerations. **Psychopharmacol.** v. 90, n. 2, p. 284-285, 1986.

TURNBULL, A.V.; LEE, S.; RIVIER, C. Mechanisms of hypothalamic–pituitary–adrenal axis stimulation by immune signals in the adult rat. **Ann N Y Acad Sci.** v. 840, p. 434–443, 1998.

TIRUPPATHI, C.; FREICHEL, M.; VOGEL, S.M. et al. Impairment of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in TRPC4 (-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. **Circ Res.** v. 91, n. 1, p. 70-76, 2002.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J. Thermosensation and pain. **J Neurobiol.** v. 61, n. 1, p. 3-12, 2004.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain producing stimuli. **Neuron.** v. 21, n.3, p. 531-43, 1998.

TOTH, A.; BOCZAN, J.; KEDEI, N. et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Brain Res Mol Brain Res.** v. 135, p. 162-68, 2005.

TOTH, D.M.; SZOKE, E.; BOLCSKEI, K. et al. Nociception, neurogenic inflammation and thermoregulation in TRPV1 knockdown transgenic mice. **Cell Mol Life Sci.** v. 68, p. 2589–2601, 2011.

TREVISANI, M.; PATACCHINI, R.; NICOLETTI, P. et al. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. **Br J Pharmacol.** v.145, p. 1123–1131, 2005.

TSUJI, F.; MURAI, M.; OKI, K. et al. Effects of SA13353, a transient receptor potential vanilloid 1 agonist, on leukocyte infiltration in lipopolysaccharide-induced acute lung injury and ovalbumin-induced allergic airway inflammation. **J Pharmacol Sci.** v. 112, n.4, p. 487-490, 2010.

UMATHE, S.N.; MANNA, S.S.; JAIN, N.S. Endocannabinoid analogues exacerbate marble-burying behavior in mice via TRPV1 receptor. **Neuropharmacology.** v. 62, p. 2024-2033, 2012.

VAN DER POLL, T.; VAN DEVENTER, S.J. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. **Infect Dis Clin North Am.** v.13, p. 413-23, 1999.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. **Neuromolecular Med.** v. 7, n. 1-2, p. 37-50, 2005

VOETS, T.; TALAVERA, K.; OWSIANIK, G. et al. Sensing with TRP channels. **Nat Chem Biol.** v. 1, p. 85–92, 2005.

VILLALTA, P.C.; TOWNSLEY, M.I. Transient receptor potential channels and regulation of lung endothelial permeability. **Pulm Circ.** v.3, n. 4, p. 802-815, 2013.

WALPOLE, C.S.J.; BEVAN, S.; BOVERMANN, G. et al. The Discovery of Capsazepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants Capsaicin and Resiniferatoxin. **J Med Chem.** v. 37, p. 1942–1954, 1994.

WAN, W.; WETMORE, L.; SORENSEN, C.M. et al. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress induced c-fos expression in the rat brain. **Brain Res Bull.** v. 34, p. 7- 14, 1994.

WANG, Y.; NOVOTNY, M.; QUAISEROVA-MOCKO, V. et al. TRPV1-mediated protection against endotoxin-induced hypotension and mortality in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 294, n.5, p. R1517-R1523, 2008.

WANG, Y.; WANG, D.H. TRPV1 Ablation Aggravates Inflammatory Responses and Organ Damage during Endotoxic Shock. **Clin Vaccine Immunol.** v. 20, n. 7, p. 1008–1015, 2013.

WANNER, S.P.; YOSHIDA, K.; KULCHITSKY, V.A. et al. Lipopolysaccharide-induced neuronal activation in the paraventricular and dorsomedial hypothalamus depends on ambient temperature. **PLoS One.** v. 8, p. e75733, 2013.

WARE, L.B.; MATTHAY, M.A. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med.** v. 342, n. 18, p. 1334-1349, 2000.

WATANABE, N.; HORIE, S.; MICHAEL, G.J. et al. Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. **Neuroscience.** v. 141, p.1533–1543, 2006.

WATKINS, L.R.; GOEHLER, L.E.; RELTON, J.K. et al. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. **Neurosci Lett**. v. 183, p. 27–31, 1995.

WEIBEL, E. R. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Gill, J. **Models of lung disease: microscopy and structural methods**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 199-247.

WEST, A.P. Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. **Prog Neuro-Psychopharm Biol Psych**. v.14, p. 863-877, 1990.

WHITEFORD, H.A.; DEGENHARDT, L.; REHM, J. et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**. v. 382, n. 9904, p. 1575–1586, 2013.

WIEDEMANN, H.P.; WHEELER, A.P.; BERNARD, G.R. et al. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. **N Engl J Med**, v. 354, p. 2564-2575, 2006.

WILCOXON, J.S.; NADOLSKI, G.J.; SAMARUT, J. et al. Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor  $\alpha$ . **Behav Brain Res**. v. 177, p.109–116, 2007

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural–neurobiological concordance in the effects of CMS **Neuropsychobiology**. v.52, p. 90–110, 2005.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**. v. 83, p.1-6, 1984.

WU, L.J.; SWEET, T.B.; CLAPHAM, D.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. **Pharmacol Rev**. v. 62, n. 3, p. 381-404, 2010.

WU, S.; CIOFFI, E.A.; ALVAREZ, D. et al. Essential role of a Ca<sup>2+</sup>-selective, store-operated current (ISOC) in endothelial cell permeability: determinants of the vascular leak site. **Circ Res**. v. 96, n. 8, p. 856-863, 2005.

WU, S.; LINDBERG, J.E.M.; PETERS, J.H. Genetic and pharmacological evidence for low-abundance TRPV3 expression in primary vagal afferent neurons. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 310, p. R794 –R805, 2016.

YADID, G.; OVERSTREET, D.H.; ZANGEN, A. Limbic dopaminergic adaptation to a stressful stimulus in a rat model of depression. **Brain Res.** v. 896, n.1-2, p. 43-47, 2001.

YAN, S.; YOU, Z.L.; ZHAO, Q.Y. et al. Antidepressant-like effects of Sanyuansan in the mouse forced swim test, tail suspension test, and chronic mild stress model. **Kaohsiung J Med Sci.** v. 31, n. 12, p. 605-612, 2015.

YAO, L.; LIU, Z.; ZHU, J. et al. Clinical evaluation of circulating microRNA-25 level change in sepsis and its potential relationship with oxidative stress. **Int J Clin Exp Pathol.** v. 8, n.7, p. 7675-7684, 2015.

YOSHIMURA, M.; MIKAMI, T.; KURODA, K. et al. Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1, (TRPV1)-expressing vagal nerve in the inhibitory effect of gastric acidification on exogenous motilin-induced gastric phase III contractions in *Suncus murinus*. **Dig Dis Sci.** 2016. No prelo.

YOU, I.J.; JUNG, Y.H.; KIM, M.J. et al. Alterations in the emotional and memory behavioral phenotypes of transient receptor potential vanilloid type 1-deficient mice are mediated by changes in expression of 5-HT(1A), GABA(A), and NMDA receptors. **Neuropharmacology.** v. 62, p. 1034–1043, 2012.

YU, X.; HU, Y.; YU, S. Effects of acid on vagal nociceptive afferent subtypes in guinea pig esophagus. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v.307, n. 4, p. G471–G478, 2015.

XING, J; LI, J. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. **J Neurophysiol.** v. 97, n.1, p. 503-11, 2007.

ZARDI, E. M.; ZARDI, D.M.; DOBRINA, A. et al. Prostacyclin in sepsis: a systematic review. **Prostag other Lipid Med.** v. 83, p. 1-24, 2007

ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **Journal of Thermal Biology.** v. 24, n. 5-6, p. 287-326, 1999.

ZHANG, R. WANG, J.; HU, Y. et al. Pifithrin- $\mu$  attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in C57BL/6J mice. **Pharmacology.** v. 97, p. 254-250, 2016.

ZHAO, H.; SPRUNGER, L.K.; SIMASKO, S.M. Expression of transient receptor potential channels and two-pore potassium channels in subtypes of vagal afferent neurons in rat. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 298, n.2, p. G212–G221, 2010.

ZYGMUNT, P.M.; PETERSSON, J.; ANDERSSON, D.A. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature.** v.400 p. 452-457, 1999.

## ANEXO I

Carta de aprovação CEUA 518/2013.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 29 de julho de 2013.

Prof. Alexandre Giusti Paiva

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 518/2013, intitulado “Influência do receptor vaniloide tipo 1 (TRPV1) no comportamento doentio durante sepse induzida por lipopolissacarídeo” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento  
Presidente da CEUA – Unifal-MG

Carta de aprovação CEUA 567/2014.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 16 de julho de 2014.

Prof. Alexandre Giusti Paiva

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 567/2014, intitulado “Influência do receptor vanilóide tipo 1 (TRPV1) na sepse induzida por lipopolissacarídeo” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento  
Presidente da CEUA – Unifal-MG

## The Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Antagonist Capsazepine Improves the Impaired Lung Mechanics during Endotoxemia

Layla D. M. Cabral<sup>1,2</sup> and Alexandre Giusti-Paiva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Multicenter Graduate Program in Physiological Sciences, Brazilian Society of Physiology, São Paulo, SP, Brazil and <sup>2</sup>Department of Physiological Sciences, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas-MG, Alfenas, MG, Brazil

(Received 10 December 2015; Accepted 4 April 2016)

**Abstract:** Acute lung injury (ALI) caused by systemic inflammatory response remains a leading cause of morbidity and mortality in critically ill patients. Management of patients with sepsis is largely limited to supportive therapies, reflecting an incomplete understanding of the underlying pathophysiology. Furthermore, there have been limited advances in the treatments for ALI. In this study, lung function and a histological analysis were performed to evaluate the impact of transient receptor potential vanilloid-1 receptor (TRPV1) antagonist (capsazepine; CPZ) on the lipopolysaccharide (LPS)-induced lung injury in mice. For this, adult mice pre-treated with CPZ or vehicle received intraperitoneal injections of LPS or saline and 24 hr after, the mice were anaesthetized, and lung mechanics was evaluated. The LPS-challenged mice exhibited substantial mechanical impairment, characterized by increases in respiratory system resistance, respiratory system elastance, tissue damping and tissue elastance. The pre-treatment with CPZ prevented the increase in respiratory system resistance and decreased the increase in tissue damping during endotoxemia. In addition, mice pre-treated with CPZ had an attenuated lung injury evidenced by reduction on collapsed area of the lung parenchyma induced by LPS. This suggests that the TRPV1 antagonist capsazepine has a protective effect on lung mechanics in ALI during endotoxemia and that it may be a target for enhanced therapeutic efficacy in ALI.

Lung injury can be caused by inflammatory responses elicited by diverse stimuli. However, there have been limited advances in the treatments for lung injury. Therefore, a better understanding of the underlying biochemical processes that contribute to lung injury during systemic inflammation is needed [1–3]. Identifying endogenous inflammatory molecules that mediate inflammation and lung injury, which is often a lethal complication of common human maladies, is an important goal with immediate diagnostic and therapeutic significance [1,2,4].

Numerous studies have indicated that transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1), a calcium-selective ion channel that is activated by capsaicin, is a mediator of lung injury caused by sepsis and lipopolysaccharide (LPS) exposure [5–7]. Immunohistochemical studies confirmed the presence of TRPV1 in airway sensory fibres lining the trachea, bronchi and alveoli as well as the nasal mucosa [8]. Several studies have investigated the pharmacology, regulation, structure–function relationships and physiological roles of TRPV1 [2,4,9]. TRPV1 is sensitized after activation of neuronal receptors for bradykinin, prostaglandins, histamine, purines, proteases, chemokines and many other pro-inflammatory mediators, including hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) [6], anandamide (AEA), 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). It is also activated by hydroperoxyeicosatetraenoic acids (HpETEs) and hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs)

derived from arachidonic acid and often referred to as endovanilloids [7,9–11].

Animal studies have yielded conflicting results on the role of TRPV1 in survival and multiple organ damage during sepsis [2,3,12,13]. Thus, the role of TRPV1 in the pathophysiology of sepsis is not completely understood. In addition, lung cells from the conducting airways, alveoli and pulmonary capillaries of human beings and mice express TRPV1 mRNA and exhibit endoplasmic reticulum stress when exposed to the TRPV1 agonist's non-ivamide and AEA [14]. Previous histochemical and biological analyses demonstrated that deleting TRPV1 accelerates renal and hepatic injury, including further increasing serum creatinine and alanine aminotransferase levels after LPS injection [15]. Specifically, rats treated with LPS and a TRPV1 antagonist [16] as well as *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice with peritoneal sepsis [17] exhibited exacerbated LPS-induced hypotension as well as greater mortality. However, contrary to reports suggesting a protective role of TRPV1, previous studies showed that pharmacological disruption of TRPV1 with capsazepine has beneficial effects during peritonitis and sepsis [2,5,6]. Ang and colleagues [5] showed that in a model of polymicrobial sepsis, one dose of capsazepine administered 30 min. before caecal ligation and puncture (CLP) increased survival and decreased liver and lung damage.

Despite previous studies showing TRPV1 involvement in inflammatory responses in lung tissue, its influence on respiratory physiology, specifically respiratory mechanics, in cases with systemic inflammation has not been demonstrated. The purpose of this study was to evaluate the effect of administering a TRPV1 antagonist on pulmonary mechanics in mice exposed to endotoxemia.

Author for correspondence: Alexandre Giusti-Paiva, Laboratório de Fisiologia Translacional, Av. Jovino Fernandes Sales, 2600 Prédio E, Sala 300, 37130-000 – Alfenas – MG, Brazil (fax +55-35-32991063, e-mails agiustipaiva@gmail.com; giustipaiva@unifal-mg.edu.br).

### Materials and Methods

**Animals.** Adult male Swiss mice (30–35 g) were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas. Animals were housed under controlled light (12-hr light/dark cycle; lights on at 07:00 a.m.) and temperature conditions ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with *ad libitum* access to water and food. Animals were allowed to habituate to the housing facilities for at least 1 week prior to the experiments. All experiments were conducted in accordance with the ARRIVE guidelines (Animals in Research: Reporting *In Vivo* Experiments) and the Brazilian Regulations for Animal Experimentation (COBEA) that address the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas (protocol number: 567/2014).

**Measurement of lung mechanics.** An invasive lung function analysis was performed on mice anaesthetized with ketamine (34 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg). After tracheostomy, an 18-gauge stainless steel cannula was inserted into the trachea, and mice were placed on a FlexiVent system (Scireq, Montreal, QC, Canada) for forced oscillatory measurements. The animals were paralysed with pancuronium bromide (0.5 ml/kg, i.p.) and kept warm using a heating pad. Ventilation was maintained at a rate of 180 breaths/min. and a tidal volume of 10 ml/kg, with a positive end-expiratory pressure of 3.0 cm of  $\text{H}_2\text{O}$  to prevent alveolar collapse. Total lung capacity, Snapshot and Prime-8 were consecutively performed using the FlexiVent system. A measurement circuit was pressurized to the desired pressure before each animal was switched into the circuit. A single-compartment model of respiratory mechanics was used to assess lung function after the saline or LPS administration. Respiratory mechanics were assessed using a 1.2-sec., 2.5-Hz single-frequency forced oscillation technique (SFOT; using a SnapShot-150 perturbation) and an 8-sec., broadband, low-frequency forced oscillation technique (LFOT) containing 13 mutually prime frequencies between 1 and 20.5 Hz (using a Prime-8 perturbation). Both perturbation settings were configured to ensure that transient onsets were omitted and oscillations had reached steady-state in the analysed portions of the manoeuvres. Respiratory system resistance (Rrs) and elastance (Ers) were calculated using the FlexiVent software (Scireq, Montreal, QC, Canada) by fitting an equation of motion for a linear single-compartment model of lung mechanics to SFOT data using multiple linear regressions. Respiratory system input impedance was calculated from LFOT data. Newtonian resistance (RN), tissue damping (G) and tissue elastance (H) were determined by iteratively fitting the constant-phase model to input impedance [18].

**Drug administration.** Drugs were purchased from Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA). Lipopolysaccharide (LPS) extracted from *Escherichia coli* serotype 026:B6 (Sigma-Aldrich) was dissolved in sterile isotonic saline (0.9% NaCl) and administered at doses of 0.2, 1.0 or 5.0 mg/kg. The TRPV1 receptor antagonist, capsazepine, [N-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-2H-2-benzazepine-2-carbothioamide] was dissolved in a solution containing 0.9% NaCl, Tween and DMSO at a ratio of 8:1:1. Capsazepine (at dose of 15 mg/kg) or vehicle were administered by subcutaneous (s.c.) injections immediately before saline or LPS that were administered by intraperitoneal (i.p.) injections.

**Experimental protocols.** Acute lung injury (ALI) was induced by endotoxemia model: to evaluate the effects of endotoxemia on induced acute lung injury (ALI), mice ( $n = 10$ – $12$  per group/time-point) were treated with 10 ml/kg sterile isotonic saline (i.p.) or 0.2, 1.0 or 5.0 mg/kg of LPS, 2, 6 or 24 hr prior to lung mechanics evaluation.

To verify the role of TRPV1 on lung mechanics during LPS-induced ALI, the animals ( $n = 10$  per group) were pre-treated with

vehicle or capsazepine (15 mg/kg; s.c.), then received saline or LPS (5 mg/kg, i.p.) after 10 min. Thus, the mice were randomly divided into four groups with 10 mice in each group: (i) control (vehicle + saline), (ii) capsazepine + saline, (iii) vehicle + LPS and (iv) capsazepine + LPS. After a 24-hr treatment with saline or LPS, the mice were anaesthetized and paralysed with pancuronium bromide and lung mechanics function was evaluated. Afterwards, the lungs were removed for histology. These time-points were chosen on the basis of previous studies [5,19].

**Lung histology.** A laparotomy was performed, and heparin (1000 IU) was injected under anaesthesia. Each trachea was clamped at end expiration with a positive end-expiratory pressure (PEEP) = 3 cm  $\text{H}_2\text{O}$ . Animals were killed by severing the abdominal aorta and vena cava, which produces massive haemorrhage and rapid death by exsanguination. Lungs were removed *en bloc* at the same PEEP level in both groups to avoid distortion of lung morphometry. The right lung was fixed in 3% buffered formaldehyde and embedded in paraffin. Slices (4  $\mu\text{m}$  thick) were cut and stained with haematoxylin and eosin. Lung morphometry was assessed using an integrating eyepiece within a coherent system consisting of a grid with 100 points and 50 lines of known length coupled with a conventional light microscope (Olympus BX51; Olympus Latin America, Inc., São Paulo, SP, Brazil). Sections were examined at  $200\times$  magnification, and fractions of the lung occupied by hyperinflated structures (alveolar ducts, alveolar sacs or alveoli wider than 120  $\mu\text{m}$ ), collapsed alveoli (alveoli with rough or plicate walls) and normal pulmonary areas (those without overdistended or plicate walls) were determined by the point-counting technique [20]. The number of alveolar intercepts was counted and divided by the total length of straight lines. This analysis was performed in 10 random, non-overlapping fields in each lung. Points falling on normal or collapsed alveoli were expressed as percentage of total points of the grid [20].

**Statistical analysis.** Data were analysed using Graphpad Software Inc (La Jolla, CA, USA) program version 6.0 and were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. The data of different doses of LPS on lung mechanics were analysed by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's *post hoc* test. The effects of pre-treatment (vehicle or capsazepine) and treatment (saline or LPS) were assessed using two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. A *p*-value less than 0.05 ( $p < 0.05$ ) was used to establish significance.

### Results

Figure 1 shows the time course of the lung mechanic effects in the animals that received LPS (0.2, 1.0 and 5.0 mg/kg). Different doses were analysed in each time-point singly and only the 5.0 mg/kg dose of LPS administered 24 hr prior to the lung mechanics evaluation induced an increase in respiratory system resistance ( $F_{3,41} = 2.86$ ;  $p < 0.01$ ; fig. 1A), respiratory system elastance ( $F_{3,41} = 5.23$ ;  $p < 0.001$ ; fig. 1B), tissue damping ( $F_{3,41} = 4.93$ ;  $p < 0.01$ ; fig. 1C) and tissue elastance ( $F_{3,41} = 5.36$ ;  $p < 0.01$ ; fig. 1D) and a decrease in airway resistance ( $F_{3,41} = 3.01$ ;  $p < 0.05$ ; fig. 1E). These lung mechanics parameters did not change in the animals treated with saline during the 24-hr evaluation.

Pre-treatment with capsazepine prevented the increase in respiratory system resistance (pre-treatment factor:  $F_{1,37} = 4.15$ ,  $p < 0.05$ ; treatment factor:  $F_{1,37} = 31.3$ ,  $p < 0.001$ ; interaction:  $F_{1,37} = 5.08$ ,  $p < 0.05$ ; fig. 2A) and blocked the tissue damping induced by LPS (pre-treatment

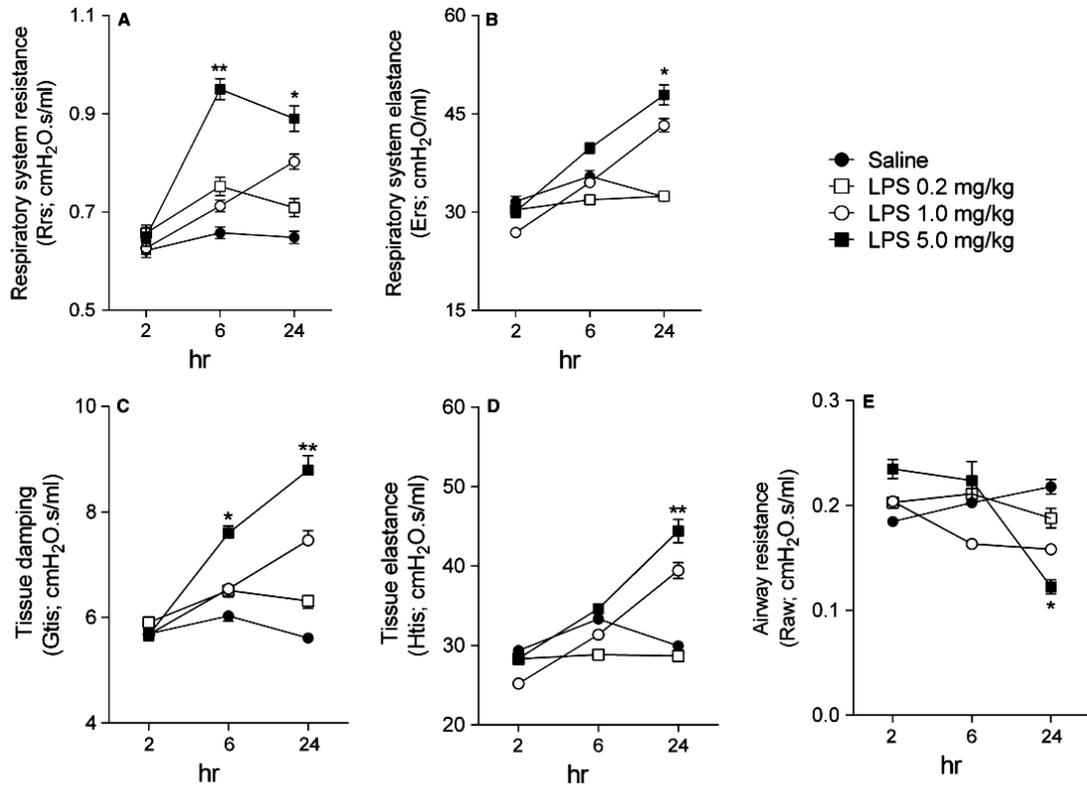


Fig. 1. Time course of the effects of the saline or lipopolysaccharide (LPS; 0.2, 1.0 or 5.0 mg/kg, intraperitoneally) treatment on lung mechanics in the mice ( $n = 10-12$  per group/time-point): (A) respiratory system resistance (Rrs), (B) respiratory system elastance (Ers), (C) tissue damping (Gtis), (D) tissue elastance (Htis) and (E) airway resistance (Raw). Each point represents the mean and S.E.M. The symbols denote the significance levels: \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared with the control (saline) group.

factor:  $F_{1,37} = 3.50$ ,  $p = 0.06$ ; treatment factor:  $F_{1,37} = 48.6$ ,  $p < 0.001$ ; interaction:  $F_{1,37} = 5.39$ ,  $p < 0.05$ ; fig. 2C). However, capsazepine did not change the lung mechanics parameters related to respiratory system elastance (pre-treatment factor:  $F_{1,37} = 0.11$ ,  $p = 0.73$ ; treatment factor:  $F_{1,37} = 33.2$ ,  $p < 0.001$ ; interaction:  $F_{1,37} = 0.03$ ,  $p = 0.84$ ; fig. 2B), tissue elastance (pre-treatment factor:  $F_{1,37} = 0.86$ ,  $p = 0.35$ ; treatment factor:  $F_{1,37} = 48.6$ ,  $p < 0.001$ ; interaction:  $F_{1,37} = 0.33$ ,  $p = 0.56$ ; fig. 2D) or airway resistance (pre-treatment factor:  $F_{1,37} = 0.35$ ,  $p = 0.55$ ; treatment factor:  $F_{1,37} = 17.6$ ,  $p < 0.001$ ; interaction:  $F_{1,37} = 0.02$ ,  $p = 0.88$ ; fig. 2E) in the animals treated with saline or LPS.

The animals treated with LPS had a decreased percentage normal alveoli area (fig. 3) and a consequent increase in the collapsed alveoli area (fig. 3) compared with the control animals. Administration of the TRPV1 inhibitor to the endotoxemic mice prevented the effect of LPS on morphology in both the normal (pre-treatment factor:  $F_{1,32} = 12.5$ ,  $p < 0.01$ ; treatment factor:  $F_{1,32} = 42.3$ ,  $p < 0.001$ ; interaction:  $F_{1,32} = 23.4$ ,  $p < 0.001$ ; fig. 3) and the collapsed areas (pre-treatment factor:  $F_{1,32} = 12.4$ ,  $p < 0.01$ ; treatment factor:  $F_{1,32} = 43.0$ ,  $p < 0.001$ ; interaction:  $F_{1,32} = 23.2$ ,  $p < 0.001$ ; fig. 3).

However, pre-treatment did not change this parameter in the control mice. Figure 4 shows representative photomicrographs of the lung parenchyma in the four groups.

## Discussion

The goal of this study was to characterize the functional role of TRPV1 in lung mechanics during systemic inflammation induced by LPS. The respiratory resistance, respiratory elastance, tissue damping and tissue elastance of the LPS-treated mice were significantly increased compared with the control mice, suggesting that parenchymal mechanical dysfunction plays an important role in the pathophysiology of experimental ALI. Although capsazepine acts as a competitive antagonist of capsaicin [21] and also presents activity in acetylcholine receptors [22] and voltage-gated calcium channels [23], it has been used as a standard competitive antagonist of TRPV1 receptor in pharmacological studies with *in vitro* and *in vivo* approaches [24-26]. We provide evidence that pre-treatment with capsazepine reverses the increase in respiratory system resistance, attenuates the increase in tissue damping and decreases the collapsed area of the lung parenchyma in

4

LAYLA D. M. CABRAL AND ALEXANDRE GIUSTI-PAIVA

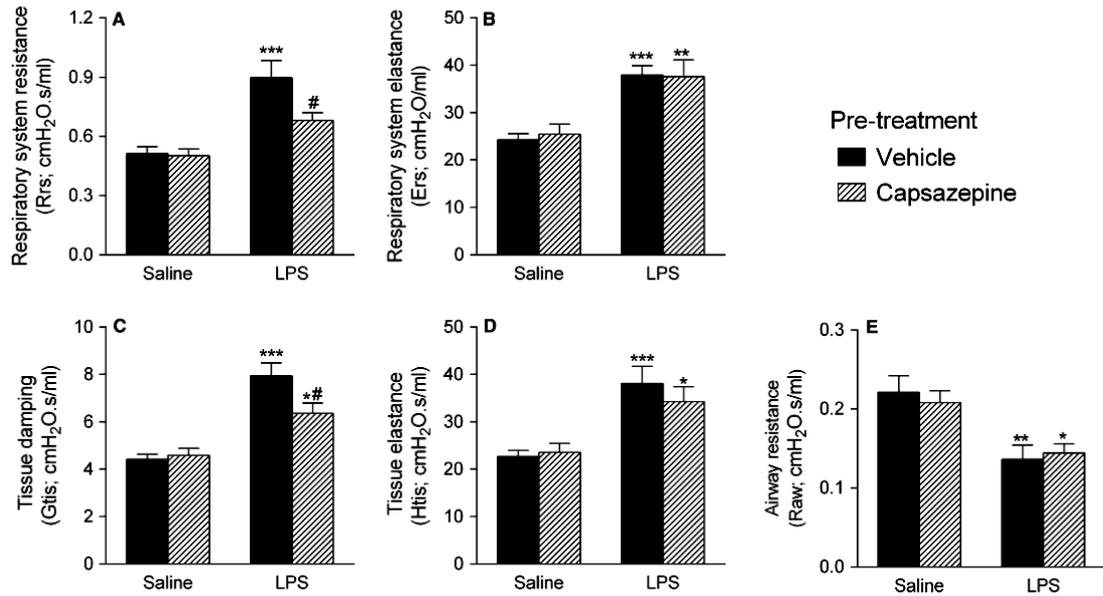


Fig. 2. Effects of pre-treatment with vehicle (10 ml/kg, subcutaneous; s.c.) or capsazepine (15 mg/kg, s.c.) on the lung mechanics of the mice treated with saline (10 ml/kg, i.p.) or lipopolysaccharide (LPS; 5.0 mg/kg, i.p.): (A) respiratory system resistance (Rrs), (B) respiratory system elastance (Ers), (C) tissue damping (Gtis), (D) tissue elastance (Htis) and (E) airway resistance (Raw). Each bars represents the mean and S.E.M. of n = 10 animals per group. The symbols denote the significance levels: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 compared with the control group (vehicle + saline); #*p* < 0.05 compared with the vehicle + LPS group.

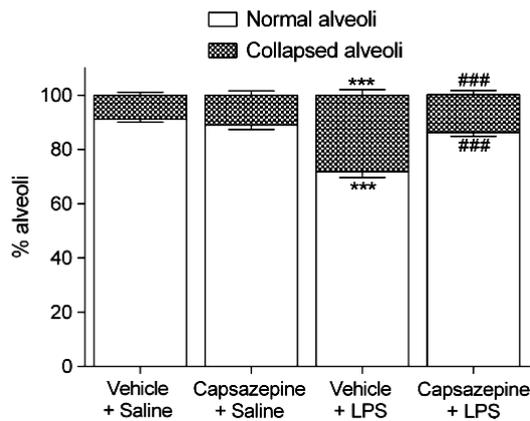


Fig. 3. Percentage of normal and collapsed alveoli in the mice pre-treated with vehicle (10 ml/kg, s.c.) or capsazepine (15 mg/kg, s.c.) and were then treated with saline (10 ml/kg, i.p.) or lipopolysaccharide (LPS; 5.0 mg/kg, i.p.). The data are presented as the mean ± S.E.M. of 10 mice per group measured 24 hr after the saline or LPS treatment. The symbols denote the significance levels: \*\*\**p* < 0.001 compared with the control group (vehicle + saline); ###*p* < 0.001 compared with the vehicle + LPS group.

LPS-induced ALI. This suggests that the TRPV1 antagonist has a protective effect in ALI during endotoxemia.

Sepsis from gram-negative infections is caused by an exaggerated host response to the infection [3] and is the most

relevant and lethal cause of ALI/ARDS [1,3]. During sepsis, systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is an aggravating factor that leads to a systemic release of cytokines and other inflammatory mediators that causes organ dysfunction and failure [1,27]. A model of LPS-induced ALI has been used to mimic the morphological and functional changes observed in clinical situations resulting from circulating LPS [18]. LPS administration triggers a network of inflammatory responses mediated by a number of immune cells [28]. LPS promotes the activation of mononuclear phagocytes and also facilitates the migration and infiltration of polymorphonuclear cells into pulmonary spaces [29].

Previous reports have shown that exposure to LPS induces increased lung elastance and viscoelastic properties of lung tissue, suggesting a greater pressure dissipation to overcome pulmonary viscoelastic and/or inhomogeneous components [28]. Similar to this study, previous studies have not shown increased transpulmonary pressure, which indicates that LPS exposure does not cause airway constriction or changes in central airway responsiveness. However, an increase in collapsed alveolar areas with higher doses of LPS was correlated with increased viscoelastic parameters, which indicates that tissue and/or small airway involvement is responsible for increased pulmonary resistance after LPS exposure [20]. In our study, pre-treatment with the TRPV1 antagonist decreased the LPS-induced collapsed lung parenchyma area and reversed and/or decreased the increases in respiratory system resistance and tissue damping.

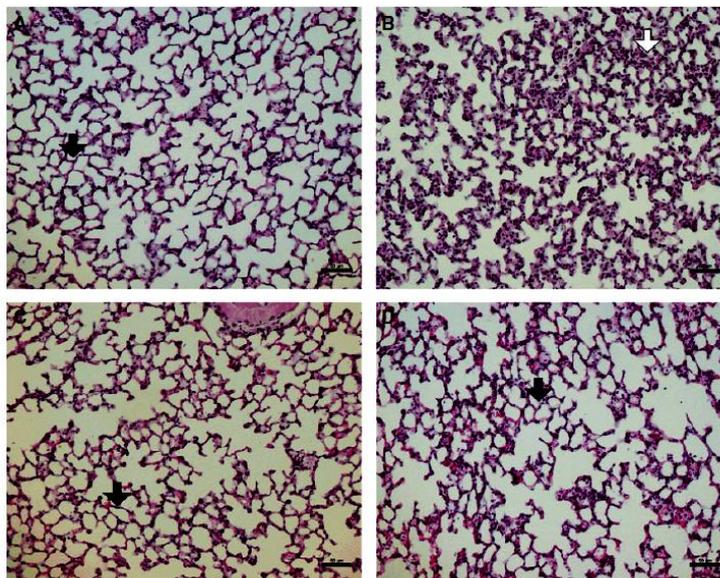


Fig. 4. Representative photomicrographs of the lung parenchyma: (A) vehicle + saline; (B) vehicle + LPS; (C) capsazepine + saline; and (D) capsazepine + LPS. The mice were pre-treated with vehicle (10 ml/kg; s.c.) or capsazepine (15 mg/kg; s.c.) 30 min. before receiving saline (10 ml/kg; i.p.) or lipopolysaccharide (5.0 mg/kg; i.p.). Photographs were taken at an original magnification of  $\times 200$  from the slides stained with haematoxylin and eosin. The black arrow represents a normal alveoli and the white arrow a collapsed alveoli.

During ALI, the pulmonary endothelial cell barrier is disrupted, which leads to extravascular fluid accumulation within the lung interstitium. Ultimately, this fluid accumulation occurs because increased capillary permeability leads to alveolar fluid filling and consequent surfactant inactivation, which decreases pulmonary compliance and impairs gas exchange [30–32]. However, stimuli, such as 14,15-epoxyeicosatrienoic acid [33], increase capillary permeability without increasing permeability in extra-alveolar segments. Such endothelial barrier disruption is often dependent upon  $\text{Ca}^{2+}$  entering from the extracellular space [34]. The extra-alveolar vessel endothelium is targeted, and the septal microvasculature appears to be spared [35]. Although endothelial cells derived from the extra-alveolar pulmonary arteries and septal microvessels are phenotypically distinct, both could potentially be targeted in ALI [4,35].

The decrease in compliance is attributed to the presence of perivascular cuffs that increase tissue resistance without increasing airway resistance [36, 37]. Perivascular cuffs may impact the mechanical coupling efficiency between the bronchovascular bundle and parenchyma. Under normal circumstances, a mechanical interdependence of lung regions maintains open airways and alveoli. However, the presence of perivascular cuffs may interrupt this interdependence and cause alveolar collapse and/or increased tissue heterogeneity, which leads to increased tissue resistance [36,37].

In fact, research has demonstrated a protective role for TRPV1 channel activity in experimental models of sepsis [2,13,16]. Although specific neuropeptides involved in this

protective role of TRPV1 during sepsis remain to be identified, there is increasing evidence that neuropeptides are synthesized in non-neural sources, for example mononuclear cells and lymphocytes [2,4]. They can be released in a TRPV1-independent manner, especially under inflammatory conditions. Pro-inflammatory neuropeptides, such as substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide, are localized in capsaicin-sensitive unmyelinated and thinly myelinated sensory fibres in the airways of several species [38]. The release of these neuropeptides from nerve terminals and their participation in enhancing both vascular and cellular phases of several inflammatory reactions are well-established [4, 28, 38]. However, the involvement of TRPV1 in inflammatory responses in lung tissue is still contradictory. In a model of LPS-induced acute lung inflammation, pre-treatment with a TRPV1 agonist inhibited both neutrophil infiltration and the increase in  $\text{TNF-}\alpha$  and CINC-1 in the lung [39]. In contrast, endotoxin-induced inflammation and bronchial hyper-responsiveness were enhanced in TRPV1-deficient mice [12]. Although there are relevant studies on the involvement of TRPV1 in inflammatory processes in the lung, studies on the role of receptors in respiratory physiology during systemic inflammation processes are lacking. This study provides evidence that TRPV1 blocking modulates an increase in respiratory system resistance and in the collapsed area of the lung parenchyma during endotoxemia. Collectively, these results demonstrate a role for TRPV1 in endotoxin-induced lung injury. TRPV1 inhibition may be a target for enhanced therapeutic efficacy in ALI.

### Acknowledgements

We would like to thank José Reis for his technical assistance and Dr. Roseli Soncini, Federal University of Alfenas for providing laboratory facilities. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; #APQ-01483-13), Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; #300977/2013-1) and Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES; PNPd and Pró-equipamentos).

### Author contributions

Dr L.M.D. Cabral participated in study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript and critical revision of the manuscript for important intellectual content. Dr A. Giusti-Paiva participated in study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content, administrative, technical or material support, and study supervision.

### Role of funding source

Author Alexandre Giusti-Paiva is currently receiving a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; #APQ-01483-13), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; #300977/2013-1).

### Conflict of interest

All authors declared that they have no conflict of interest.

### References

- Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334–49.
- Devesa I, Planells-Cases R, Fernández-Ballester G, González-Ros JM, Ferrer-Montiel A, Fernández-Carvajal A. Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis. *J Inflamm Res* 2011;4:67–81.
- Reiss LK, Uhlig U, Uhlig S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. *Eur J Cell Biol* 2012;91:590–601.
- Villalta PC, Townsley MI. Transient receptor potential channels and regulation of lung endothelial permeability. *Pulm Circ* 2013;3:802–15.
- Ang SF, Moochhala SM, Bhatia M. Hydrogen sulfide promotes transient receptor potential vanilloid 1-mediated neurogenic inflammation in polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 2010;38:619–28.
- Ang SF, Sio SW, Moochhala SM, MacAry PA, Bhatia M. Hydrogen sulfide upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E metabolite in sepsis-evoked acute lung injury via transient receptor potential vanilloid type 1 channel activation. *J Immunol* 2011;187:4778–87.
- Zholos AV. TRP channels in respiratory pathophysiology: the role of oxidative, chemical irritant and temperature stimuli. *Curr Neuropharmacol* 2015;13:279–91.
- Watanabe N, Horie S, Michael GJ, Spina D, Page CP, Priestley JV. Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. *Pulm Pharmacol Ther* 2005;18:187–97.
- Geppetti P, Materazzi S, Nicoletti P. The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. *Eur J Pharmacol* 2006;533:207–14.
- De Petrocellis L, Di Marzo V. Lipids as regulators of the activity of transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels. *Life Sci* 2005;77:1651–66.
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J *et al*. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6155–60.
- Helyes Z, Elekes K, Németh J, Pozsgai G, Sándor K, Kereskai L *et al*. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L1173–81.
- Fernandes ES, Liang L, Smillie SJ, Kaiser F, Purcell R, Rivett DW *et al*. TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome. *J Immunol* 2012;188:5741–51.
- Thomas KC, Sabnis AS, Johansen ME, Lanza DL, Moos PJ, Yost GS *et al*. Transient receptor potential vanilloid 1 agonists cause endoplasmic reticulum stress and cell death in human lung cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321:830–8.
- Wang Y, Wang DH. TRPV1 ablation aggravates inflammatory responses and organ damage during endotoxic shock. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20:1008–15.
- Wang Y, Novotny M, Quaiserova-Mocko V, Swain GM, Wang DH. TRPV1-mediated protection against endotoxin-induced hypotension and mortality in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294:R1517–23.
- Clark N, Keeble J, Fernandes ES, Starr A, Liang L, Sugden D *et al*. The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor protects against the onset of sepsis after endotoxin. *FASEB J* 2007;21:3747–55.
- Shalaby KH, Gold LG, Schuessler TF, Martin JG, Robichaud A. Combined forced oscillation and forced expiration measurements in mice for the assessment of airway hyperresponsiveness. *Respir Res* 2010;11:82.
- Kabir K, Gelinas JP, Chen M, Chen D, Zhang D, Luo X *et al*. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock* 2002;17:300–3.
- Rocco PR, Momesso DP, Figueira RC, Ferreira HC, Cadete RA, Légora-Machado A *et al*. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. *Eur Respir J* 2003;22:20–7.
- Bevan IS, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K *et al*. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 1992;107:544–52.
- Liu L, Simon SA. Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Neurosci Lett* 1997;228:29–32.
- Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol* 1997;121:1461–7.
- Maggi CA, Bevan S, Walpole CS, Rang HP, Giuliani S. A comparison of capsazepine and ruthenium red as capsaicin antagonists in the rat isolated urinary bladder and vas deferens. *Br J Pharmacol* 1993;108:801–5.
- Walpole CS, Bevan S, Bovermann G, Boelsterli JJ, Breckenridge R, Davies JW *et al*. The discovery of capsazepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants capsaicin and resiniferatoxin. *J Med Chem* 1994;37:1942–54.
- Gonzalez-Reyes LE, Ladas TP, Chiang CC, Durand DM. TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced epileptiform activity *in vitro* and electrographic seizures *in vivo*. *Exp Neurol* 2013;250:321–32.
- Sadowitz B, Roy S, Gatto LA, Habashi N, Nieman G. Lung injury induced by sepsis: lessons learned from large animal models and future directions for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:1169–78.

- 28 Faffe DS, Seidl VR, Chagas PS, Gonçalves de Moraes VL, Capezozzi VL, Rocco PR *et al.* Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in mice. *Eur Respir J* 2000;**15**:85–91.
- 29 Gonçalves de Moraes VL, Singer M, Boris Vargaftig B, Chignard M. Effect of rolipram on cyclic AMP levels in alveolar macrophages and lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse lung. *Br J Pharmacol* 1998;**123**:631–6.
- 30 Standiford TJ, Ward PA. Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Transl Res* 2016;**167**:183–91.
- 31 Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, Bhattacharya J, Collier B, Doerschuk CM *et al.* Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;**167**:1027–35.
- 32 Stevens T, Phan S, Frid MG, Alvarez D, Herzog E, Stenmark KR. Lung vascular cell heterogeneity: endothelium, smooth muscle, and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008;**5**:783–91.
- 33 Alvarez DF, King JA, Weber D, Addison E, Liedtke W, Townsley MI. Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury. *Circ Res* 2006;**99**:988–95.
- 34 Wu S, Cioffi EA, Alvarez D, Sayner SL, Chen H, Cioffi DL *et al.* Essential role of a Ca<sup>2+</sup>-selective, store-operated current (ISOC) in endothelial cell permeability: determinants of the vascular leak site. *Circ Res* 2005;**96**:856–63.
- 35 Herold S, Gabrielli NM, Vadasz I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;**305**:L665–81.
- 36 Lowe K, Alvarez D, King J, Stevens T. Phenotypic heterogeneity in lung capillary and extra-alveolar endothelial cells. Increased extra-alveolar endothelial permeability is sufficient to decrease compliance. *J Surg Res* 2007;**143**:70–7.
- 37 Lowe K, Alvarez DF, King JA, Stevens T. Perivascular fluid cuffs decrease lung compliance by increasing tissue resistance. *Crit Care Med* 2010;**38**:1458–66.
- 38 Kraneveld AD, James DE, de Vries A, Nijkamp FP. Excitatory nonadrenergic-non-cholinergic neuropeptides: key players in asthma. *Eur J Pharmacol* 2000;**405**:113–29.
- 39 Tsuji F, Murai M, Oki K, Inoue H, Sasano M, Tanaka H *et al.* Effects of SA13353, a transient receptor potential vanilloid 1 agonist, on leukocyte infiltration in lipopolysaccharide-induced acute lung injury and ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *J Pharmacol Sci* 2010;**112**:487–90.