

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ESTUDO COMPORTAMENTAL E DA EXPRESSÃO
ASTROCITÁRIA DE GFAP EM RATOS EXPOSTOS
AO LPS E TRATADOS COM MAROPITANT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

PIETRO DOMINGUES DOSSA

SÃO PAULO

2017

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ESTUDO COMPORTAMENTAL E DA EXPRESSÃO
ASTROCITÁRIA DE GFAP EM RATOS EXPOSTOS
AO LPS E TRATADOS COM MAROPITANT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

PIETRO DOMINGUES DOSSA

SÃO PAULO

2017

Dossa, Pietro Domingues.

Estudo comportamental e da expressão astrocitária de GFAP em ratos expostos ao LPS e tratados com Maropitant / Pietro Domingues Dossa. - 2017.

47 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Modelos Experimentais em Patologia e Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

1. Astrócitos.
 2. Lipopolissacarídeo.
 3. Antieméticos.
 4. Substância P. I. Bondan, Eduardo Fernandes. (orientador).
- II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

PIETRO DOMINGUES DOSSA

**ESTUDO COMPORTAMENTAL E DA EXPRESSÃO
ASTROCITÁRIA DE GFAP EM RATOS EXPOSTOS
AO LPS E TRATADOS COM MAROPITANT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/____/____

Prof.
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____

Prof.
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____

Prof.
Universidade Paulista – UNIP

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan, orientador dedicado que soube dirigir-me os passos e os pensamentos para o alcance de meus objetivos.

Agradeço ao Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten, pelo direcionamento durante a pesquisa e os fundamentais ensinamentos sobre o comportamento animal.

Aos meus pais, Sandra Regina Domingues e Rudimar José Dossa e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Agradeço a minha namorada Ligia Bocamino Viebig por toda ajuda e paciência ao longo desses anos.

Agradeço aos amigos e colegas de trabalho, Dra. Ana Carolina Lobo, Dr. Alexandre Inocêncio, Dr. Rodrigo Calsoni e Dra. Viviane Benvenga, por todos os ensinamentos e pela paciência nesse último ano.

Agradeço aos colegas Dra. Amanda da Silva Duarte, Dra. Carolina Vieira Cardoso e Dra. Juliana Tamieh, por toda ajuda durante o experimento.

A toda equipe da UNIP, em especial à Dra. Fabiana Toshie e ao Wilton dos Santos.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte desse projeto.

RESUMO

O maropitant é um antagonista do receptor NK-1 e um antiemético amplamente utilizado em cães e gatos. Diversas evidências sugerem que o maropitant possui efeitos anti-inflamatórios e ansiolíticos. Os astrócitos possuem receptores NK-1 e se caracterizam pela presença de prolongamentos dotados de filamentos intermediários, cujo componente principal é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), principal marcador para este tipo celular. O objetivo do presente estudo foi o de analisar se o maropitant tem o potencial de alterar a expressão astrocitária de GFAP e o comportamento de ratos expostos ao modelo de comportamento doentio induzido pelo LPS. Foram utilizados 40 ratos Wistar machos, divididos nos seguintes grupos: SAL - solução salina 0,9% (IP), MAR - maropitant (20mg/kg, IP), LPS-LPS (100 µg/kg, IP) e LPS+MAR - LPS + maropitant. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto para avaliação da atividade motora e exploratória, sendo analisados os parâmetros frequência locomotora, autolimpeza, frequência de levantar e contagem de bolos fecais. Os animais também foram submetidos ao teste claro/escuro, que avalia principalmente a ansiedade, sendo considerados os parâmetros tempo de permanência nos compartimentos claro e escuro, frequência de levantar e frequência locomotora. Foi realizada ainda a coleta dos encéfalos para análise imuno-histoquímica da expressão astrocitária de GFAP. Nossos resultados demonstram que o maropitant foi capaz de agir no comportamento tipo ansioso nos testes de campo aberto e claro/escuro, porém não supriu o comportamento doentio no grupo tratado com LPS. A expressão de GFAP diminuiu no grupo LPS+MAR em relação ao grupo LPS. Pode-se concluir que o maropitant foi capaz de amenizar a astroglise induzida pelo LPS e promoveu redução da defecação, porém não de alterar o comportamento doentio causado pelo LPS.

Palavras-chave: Astrócitos. LPS. Maropitant. Substância P. Antagonista do receptor NK-1.

ABSTRACT

Maropitant is an NK-1 receptor antagonist and an anti-emetic widely used in dogs and cats. Several evidences suggest that maropitant has anti-inflammatory and anxiolytic effects. Astrocytes are the most numerous glial cells present in the CNS, have NK-1 receptors and are characterized by the presence of extensions filled with intermediate filaments whose main component is the glial fibrillary acidic protein (GFAP), which serves as the main marker for this cellular type. Considering this, the objective of this study was to demonstrate if maropitant had the potential of altering the astrocytic expression of GFAP and the behavior of rats exposed to LPS model. Forty male Wistar rats were divided into the following groups: SAL - saline solution 0.9% (IP), MAR - maropitant (20mg / kg, IP), LPS (100 µg / kg, IP) and LPS+MAR. The animals were submitted to the behavioral tests of the open field, which evaluated mainly motor and exploratory activity, and the following parameters were evaluated: locomotor frequency, grooming, rearing and defecation. The animals were also submitted to the light-dark test, which evaluated mainly the anxiety behavior, evaluating the parameters: time spent in the light and dark compartments, rearing and locomotor frequency. Brain samples were collected for the immunohistochemical analysis of the astrocytic expression of GFAP. Our results demonstrate that maropitant was able to act on anxious behavior in the open field and light/dark tests, but did not suppress the sickness behavior in the group treated with LPS. GFAP expression decreased in the LPS+MAR group in relation to the LPS group. It can be concluded that the maropitant was able to attenuate the astrogliosis induced by LPS and promoted reduction of defecation, although it did not affect the sickness behavior caused by LPS.

Keywords: Astrocytes. LPS. Maropitant. NK-1 receptor antagonist. Substance P.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do delineamento experimental realizado nos grupos SAL, MAR, LPS e LPS+MAR	21
Figura 2 – Número de áreas percorridas no teste do campo aberto (como média ± desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR., * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001	27
Figura 3 –Número de vezes que o animal permaneceu ereto sobre suas patas traseiras com suas patas dianteiras no ar (como média ± desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. *p<0,05; *** p<0,001; **** p<0,0001	28
Figura 4 – Tempo médio gasto com autolimpeza (como média ± desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR.* p<0,05	28
Figura 5 – Número de bolos fecais (como média ± desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. **** p<0,0001	29
Figura 6 – Tempo de permanência no lado claro/escuro. A barra branca indica o tempo em que o animal permaneceu no lado claro, enquanto a barra preta representa o tempo que o animal permaneceu no lado escuro (como média ± desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. * p<0,05; *** p<0,001; **** p<0,0001.....	29
Figura 7 – Número de vezes que o animal permaneceu ereto sobre suas patas traseiras com suas patas dianteiras no ar no teste do claro/escuro (como média ± desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR.* p<0,05; **** p<0,0001	30
Figura 8 – Número de quadrados percorridos no teste do claro/escuro (como média ± desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. ** p<0,01; ***; p<0,001; **** p<0,0001	30
Figura 9 – Contagem total em pixels de imunoreatividade de GFAP em astrócitos (representados como média ± desvio padrão) no córtex frontal dos diferentes grupos experimentais. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001	31
Figura 10 – Imunocoloração astrocitária para GFAP no córtex frontal dos diferentes grupos experimentais. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. Obj. 40x.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Sistema nervoso central.....	9
1.2 Astrócitos	9
1.3 Substância P	11
1.4 Maropitant	13
1.5 Comportamento doentio.....	15
1.6 Ansiedade	16
1.7 LPS	17
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAL E MÉTODO	20
3.1 Animais	20
3.2 Fármacos	20
3.3 Grupos	20
3.4 Delineamento experimental.....	20
3.5 Testes comportamentais	22
3.5.1 Campo aberto	22
3.5.2 Teste claro-escuro	22
3.6 Estudo imuno-histoquímico da expressão astrocitária de GFAP	23
3.7 Quantificação da reatividade astrocitária de GFAP.....	24
3.8 Análise estatística	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Campo aberto	27
4.1.1 Frequência de locomoção.....	27
4.1.2 Frequência de levantar	28
4.1.3 Autolimpeza	28
4.1.4 Bolos fecais.....	29
4.2 Teste Claro/Escuro	29
4.2.1 Tempo de permanência no claro/escuro.....	29
4.2.2 Frequência de levantar	30
4.2.3 Frequência de locomoção.....	30
4.3 GFAP	31

5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema nervoso central

O sistema nervoso central (SNC) é composto, principalmente de neurônios e células gliais, como os astrócitos, os oligodendrócitos, a micróglia e as células ependimárias. Os neurônios são responsáveis pela transmissão da informação por meio da diferença de potencial elétrico na sua membrana, enquanto as demais células desempenham diversas funções no SNC (McGAVIN, 2013).

Além das proteínas necessárias para manter a sua estrutura e o seu metabolismo, o neurônio produz neurotransmissores. Quase todas as sinapses utilizadas para a transmissão de sinais no SNC são químicas. Nessas estruturas, o primeiro neurônio secreta por seu terminal a substância química chamada neurotransmissor, que, por sua vez, vai atuar em proteínas receptoras presentes na membrana do neurônio subsequente para promover excitação, inibição ou ainda modificar de outro modo a sensibilidade dessa célula (McGAVIN, 2013).

Os neurotransmissores atuam como mediadores químicos na comunicação intercelular por meio da ativação de receptores específicos e mensageiros secundários nas células pós-sinápticas (SÁMANO et al., 2012).

Os neurotransmissores podem ser aminas, como adrenalina (ou epinefrina), noradrenalina (ou norepinefrina), dopamina e serotonina (ou 5- hidroxitriptamina); aminoácidos, como glutamato, aspartato, ácido γ -aminobutírico (GABA) e glicina; peptídeos, como encefalina, β -endorfina, neuropeptídeo Y, dinorfina, substância P (SP) e neurotensina; purinas, como o ATP; gases, como óxido nítrico (NO) e, possivelmente, monóxido de carbono (CO) (KANDEL et al., 2003).

Conforme o tipo de neurotransmissor liberado, diferentes respostas ocorrem na célula-alvo e, após exercer sua função, o neurotransmissor é recapturado ou degradado por enzimas. Ao envolverem as sinapses, os astrócitos adquirem uma posição espacial única para regular a transmissão sináptica e as respostas neuronais (SONG; ZHAO, 2001).

1.2 Astrócitos

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma barreira capilar específica indispensável para evitar a entrada de substâncias tóxicas no SNC. Ao contrário dos

vasos de órgãos periféricos, a BHE limita o acesso de células inflamatórias e mediadores químicos ao microambiente neural, sob condições fisiológicas e patológicas (TAKESHITA; RANSOHOFF, 2012).

Os astrócitos são componentes importantes da BHE. Os prolongamentos astrocitários embainham 99% dos microvasos do SNC, sendo os processos finais desses pés separados apenas por uma fina membrana basal (HAWKINS; DAVIS, 2005). Os astrócitos regulam vários aspectos da fisiologia da BHE e influenciam determinadas características, como a permeabilidade, levando à formação de junções oclusivas entre as células endoteliais (ALVAREZ et al., 2011).

Os astrócitos têm um papel fundamental na sustentação estrutural do SNC, orientam os neurônios que estão migrando no feto até sua posição final, mantêm uma íntima relação funcional com os neurônios nos adultos, sendo importantes no metabolismo neuronal. São células essenciais para a regulação do transporte de substâncias ao SNC, devido a seu papel na indução da BHE. Ao nível bioquímico, essas células estão envolvidas na regulação de concentração dos neurotransmissores, na detoxificação da amônia e outras substâncias e na regulação da concentração dos íons de potássio. Além disso, após uma agressão, os processos astrocitários, que contêm numerosos filamentos gliais, hipertrofiam, formando a cicatriz glial (JONES et al., 2000).

Os astrócitos expressam numerosos receptores que lhes permitem responder a todos os compostos neuroativos conhecidos, incluindo neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores de crescimento, citocinas, pequenas moléculas e toxinas. Após lesão, os astrócitos ativados pelas citocinas promovem a reformulação de barreiras essenciais e restabelecimento da homeostasia iônica do SNC (LIBERTO et al., 2004).

Várias destas funções dos astrócitos são reguladas por neuropeptídeos, incluindo as taquicininas, que ativam os astrócitos por estimularem várias vias de transdução de sinal distintas: turnover de fosfatidilinositol, aumento nos níveis citoplasmáticos de Ca⁺⁺, translocação da proteína quinase C (PKC), estimulação do metabolismo de ácido aracídônico. Em resposta à substância P (SP), os astrócitos se tornam reativos e é induzida a mitogênese e a produção de vários mediadores solúveis, como citocinas, prostaglandinas e derivados da tromboxana (PALMA; MAGGI, 2000).

Diversos neuropeptídeos ou neurotransmissores podem regular as funções de astrócitos (MITROVIC et al., 1994). A SP, em particular, tem uma participação importante nestas funções (OTSUKA; YOSHIOKA, 1993). Os astrócitos expressam receptor NK1 funcional e a SP se liga a tais receptores, disparando a ativação de fosfolipase C, seguida de várias respostas funcionais, entre elas, a liberação de citocinas (PALMA; MANZINI, 1998).

Apesar de sua pronunciada heterogenicidade morfológica e bioquímica, os astrócitos caracterizam-se pela presença de prolongamentos dotados de filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP – glial fibrillary acidic protein), servindo como meio de identificação deste tipo celular (MONTEGOMERY, 1994).

A GFAP é a principal proteína de filamento intermediário entre astrócitos maduros e a regulação de sua expressão é uma das principais características da ativação de astrócitos observados após a lesão do SNC. A exata função do GFAP permanece desconhecida, a despeito do enorme número de estudos usando esse biomarcador astrocitário (MIDDELDORP; HOL, 2011). Moduladores da expressão de GFAP incluem vários hormônios como T3 e T4, glicocorticoides e inúmeros fatores de crescimento como fator de crescimento do fibroblasto (FGF), fator neurotrófico ciliar (CNTF) e fator transformante de crescimento β (TGF- β), dentre muitos outros (GOMES et al., 1999).

1.3 Substância P

A SP, uma taquicinina pertencente ao grupo das neuroquininas, é um peptídeo amplamente distribuído no SNC e periférico (MANTYH, 2002). A SP é secretada por neurônios e células inflamatórias, tais como macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células dendríticas, e atua por ligação ao receptor da neuroquinina-1 (NK-1R). Os efeitos fisiológicos das NKs são mediados por três tipos de receptores, NK-1r, NK-2r e NK-3r (PENNEFATHER et al., 2004). As NKs endógenas podem interagir com os três tipos de receptores, com diferentes graus de afinidade (MAGGI et al., 1993).

A SP é sintetizada nos ribossomas como uma proteína maior e depois convertida enzimaticamente no undecapeptídeo ativo. O peptídeo é amplamente distribuído no SNC e SNP de vertebrados. No SNC, a SP participa em várias

respostas comportamentais e na regulação da sobrevivência neuronal. A SP também regula as funções cardiovascular e respiratória e está envolvida na ativação do reflexo emético. Na medula espinhal, a SP participa na neurotransmissão da dor a estímulos nocivos e modula reflexos autonômicos, incluindo o reflexo de micção. No SNP, a SP é localizada nos neurônios sensoriais primários e nos neurônios intrínsecos dos sistemas digestório, respiratório e genitourinário (MAGGI, 2000).

Todos os sinais clássicos da inflamação (calor, rubor, tumor, dor e consequente perda da função) podem ser afetados pela SP. Mais tarde, tornou-se evidente que muitos outros neuropeptídios, incluindo demais taquicininas, peptídeo intestinal vasoativo, somatostatina, neuropeptídeo Y ou bradicininas, também efetuam várias funções na inflamação (OTTEN, 1980).

A SP afeta a inflamação de forma direta e indireta. Diretamente, a SP afeta a contração do músculo liso, a permeabilidade endotelial e o tráfego de neutrófilos e macrófagos. Além disso, a SP afeta células do sistema imune por meio da ativação de mastócitos, monócitos ou linfócitos para liberar os seus mediadores, tais como histamina, IL-1, IL-2 e imunoglobulinas. Indiretamente, estes mediadores são liberados a partir de células inflamatórias e, por sua vez, ativam as células circundantes para propagar ainda mais o processo inflamatório (STANISZ, 2001).

Além disso, os níveis aumentados de SP foram associados com o aumento da permeabilidade da BHE, a ativação da micróglia e dos astrócitos, o aumento da perda de neurônios dopaminérgicos e déficits motores. Além disso, a secreção de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para o desenvolvimento de processos inflamatórios e de lesões. Foi observado que os efeitos dos astrócitos nos neurônios dopaminérgicos não são claros, pois tanto animais tratados com SP, como tratados com antagonistas de NK-1r, apresentaram uma redução no número destas células em comparação com o grupo controle. No entanto, devido à capacidade da SP de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias a partir de astrócitos, foi sugerido que a redução nos astrócitos reativos por antagonistas de NK-1r foi benéfica e contribuiu para a preservação de neurônios dopaminérgicos (THORNTON; VINK, 2012).

Do mesmo modo, a percepção da dor associada à inflamação é, em muitos sistemas, mediada pela SP. Portanto, a SP tem sido identificada como um neuropeptídeo pró-inflamatório. Aumentos dos níveis de SP foram encontrados em muitas doenças inflamatórias tais como asma, doença inflamatória do intestino,

artrite, nefrite, infecções parasitárias e várias desordens da pele (O'CONNOR et al., 2004).

1.4 Maropitant

O maropitant é um antagonista do receptor NK-1, expresso em neurônios dorsais da medula espinhal e que se liga à substância P. O maropitant é um antiemético amplamente utilizado em cães e gatos, por ser comprovadamente eficaz e seguro na prevenção da êmese (CONDER, 2008).

No SNC, a expressão dos receptores NK-1 é elevada no núcleo caudado, putâmen, hipocampo, hipotálamo, córtex cerebral, núcleo da rafe e outras regiões. Na periferia, são encontrados principalmente em gânglios da raiz dorsal e nos neurônios intrínsecos do intestino (HARRISON; GEPPETTI, 2001). Células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos, também expressam receptores NK-1 funcionais (HO et al., 1997; COOKE et al., 1998; LAI et al., 1998).

Devido a sua ampla distribuição, o receptor NK-1 encontra-se envolvido em diversas enfermidades como na doença de Parkinson e na coreia de Huntington, bem como no abuso de drogas como a metanfetamina (YU et al., 2002) e na obesidade (KARAGIANNIDES et al., 2008). Mais especificamente, existem várias evidências que suportam seu envolvimento em diversas doenças com fundo inflamatório, com indícios de que antagonistas de NK-1r podem ser potenciais agentes terapêuticos em caso de edema cerebral traumático (DONKIN; VINK, 2010), asma (VAN RENSEN et al., 2002), artrite (KRAUSE et al., 1995), dor (LONGMORE et al., 1997), inflamação neurogênica (HARRISON; GEPPETTI, 2001) e doença periodontal (LEE et al., 2007). Biologicamente, as taquicininas são encontradas em concentrações extremamente baixas, porém, em tecidos inflamados, a SP encontra-se elevada, pois é liberada frente a diversos mediadores inflamatórios, como citocinas, radicais livres, metabólitos do ácido araquidônico e, consequentemente, parece contribuir para a amplificação da resposta inflamatória (HOLZER; HOLZER-PETSCH, 1997). Diversos antagonistas de receptores NK-1, tanto de natureza peptídica, quanto não peptídica, foram desenvolvidos e ainda estão em desenvolvimento (ensaios clínicos). Alguns como o fosaprepitant e o aprepitant

(respectivamente, Emend® e Emecort®) já são comercializados, com indicação para terapia antiemética em pacientes oncológicos.

Existem poucos estudos demonstrando a participação da SP na resposta febril. Balaskó et al. (2000) observaram que a administração central de SP causa um aumento no índice metabólico, uma diminuição na perda de calor e, consequentemente, uma elevação regulada da temperatura corporal. Estes autores evidenciaram que a administração central de antagonistas de SP reduz a resposta febril induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Esses dados mostram que este neuropeptídeo apresenta efeitos termorregulatórios e que pode, assim, modular a resposta febril a nível central. Esta taquicinina tem a capacidade de alterar a atividade de neurônios insensíveis e sensíveis à temperatura presentes na área pré-óptica do hipotálamo. O uso do antagonista bloqueia as respostas excitatórias desencadeadas pela SP em alguns neurônios de ratos (SHIBATA et al., 1988). Sabe-se também que os receptores NK-1 medeiam o controle de neurônios do núcleo paraventricular e do hipotálamo dorsomedial, duas áreas essenciais no controle da temperatura corporal (WOMACK; BARRETT-JOLLEY, 2007; WOMACK et al., 2007), ratificando que as ações desta taquicinina podem ser via receptor NK-1.

O maropitant demonstrou estar envolvido na dor. Vias da dor visceral chegam em áreas do cérebro envolvidas na percepção da dor. Algumas dessas vias, como o gânglio da raiz dorsal, o corno dorsal da medula espinhal, as projeções ascendentes da medula espinhal e as estruturas cerebrais consideradas importantes para a nociceção e processamento da dor, contêm receptores NK-1 e SP (MORRIS et al., 2004).

Em um estudo no qual foi realizado ovário-salpingo-histerectomia (OSH) em cadelas e administrado como pré-anestésico maropitant ou morfina, foi demonstrado que o maropitant pode minimizar os batimentos cardíacos e a pressão arterial sistólica em resposta à estimulação cirúrgica, enquanto manteve os requisitos da anestesia com isoflurano ligeiramente mais baixos, quando comparados com cães que receberam a morfina como pré-anestésico. A qualidade inicial de recuperação também parece ser melhor e os cães são mais propensos a comer dentro do período de recuperação após 3 horas, quando o maropitant é usado como um pré-anestésico. Não foram observadas diferenças significantes nos parâmetros cardio-respiratórios ou requisitos anestésicos entre maropitant e morfina (MARQUEZ et al.,

2015), o que demonstra que o maropitant pode ter o mesmo efeito analgésico dos opioides. O maropitant também diminuiu os requisitos anestésicos durante a estimulação visceral do ovário e seus ligamentos em cães. Os resultados sugerem o papel potencial dos antagonistas do receptor NK-1 em regular a dor visceral (BOSCAN et al., 2011).

Mikawa et al. (2015) observaram que o maropitant induziu distúrbio da motilidade no íleo e no cólon *ex vivo* e *in vivo* em ratos e não mostrou ação anti-inflamatória significante avaliada no pós-operatório de ratos submetidos à cirurgia abdominal. Porém, devemos ressaltar que este estudo investigou apenas o nível de inflamação nas camadas musculares intestinais e ainda não existem estudos sobre os efeitos anti-inflamatórios do maropitant em outras áreas, como, por exemplo, no tecido nervoso.

1.5 Comportamento doentio

O comportamento doentio, por definição, envolve alterações comportamentais que podem incluir anorexia, diminuição da atividade exploratória ambiental e social, além da diminuição da atividade sexual, além de quadros de anedonia e de diminuição da memória (HART, 1988; KINOSHITA, 2007). O comportamento de animais injetados com LPS, seja perifericamente ou centralmente, tem sido estudado por diversos autores (KENT et al., 1992; DANTZER, 2001). De modo geral, esses animais apresentam uma atividade locomotora diminuída, redução na exploração do ambiente físico e social, redução da ingestão de água e comida, além de um prejuízo no aprendizado e na memória (DANTZER, 2001).

O comportamento de estar doente não seria um mal adaptativo ou mesmo um efeito indesejável da doença, mas uma estratégia comportamental visando à sobrevivência durante momentos críticos da vida do animal, ou seja, uma tentativa de vencer o estado patológico desencadeado (HART, 1988; DANTZER, 2001; KINOSHITA, 2007).

A alteração dos parâmetros comportamentais considerados normais para comportamentos típicos do estado doentio é fundamental para que o organismo possa debelar um agente infeccioso, visando à eliminação dos patógenos. Estudos indicam, assim, que o comportamento doentio está relacionado com uma estratégia motivacional para que o organismo lide com a doença (KINOSHITA, 2007).

A diminuição da atividade exploratória/locomotora é outra característica marcante do comportamento doente (DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010). Em roedores, a administração de LPS promove a diminuição da exploração em ambientes novos, além da diminuição do comportamento social (LARSON; DUNN, 2001).

1.6 Ansiedade

Numerosas pesquisas no campo da ansiedade têm mostrado que as raízes biológicas da ansiedade encontram-se nas reações de defesa que os animais exibem em resposta a diferentes estímulos em situações de perigo (SANDFORD et al., 2000). A ansiedade é descrita como um estado emocional de grande valor adaptativo que é experienciado de maneira subjetiva como sendo desagradável, tendo como características o medo, a apreensão, o temor e sentimentos correlatos. Sua expressão envolve alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivas. Ao contrário do medo, que se manifesta em situações em que o perigo é iminente, a ansiedade se manifesta em situações nas quais o perigo é apenas potencial e incerto (GRAEFF, 1994).

Atualmente, existem várias evidências de que os neuropeptídeos desempenham um papel importante na modulação do estado de ansiedade (RUPNIAK et al., 2000; GAVIOLI et al., 2002). A SP, assim como outras neurocininas, está distribuída por várias regiões do SNC envolvidas na modulação da ansiedade (GRAEFF, 1994).

Estudos prévios mostraram que a ansiedade experimental pode ser modulada pela manipulação de mecanismos centrais que envolvem os receptores neurocinérgicos NK-1, NK-2 e NK-3. Dados da literatura mostram uma ação ansiolítica da SP, que, quando administrada centralmente, produziu uma diminuição dos níveis plasmáticos de ACTH. Por sua vez, a injeção de um antagonista NK-1 aumentou os níveis plasmáticos de ACTH e de corticosterona (LARSEN et al., 1993). Por outro lado, evidências diretas e indiretas sustentam o papel ansiogênico da SP e uma ação ansiolítica de seus antagonistas (SANTARELLI et al., 2001).

A administração intraperitoneal do antagonista do receptor NK-1 CP 96345 em camundongos promoveu um aumento tanto na latência para a entrada dos animais no compartimento escuro da caixa claro-escuro como no tempo dispendido

no compartimento claro, sugerindo uma ação do tipo ansiolítica (ZERNIG et al., 1993).

Fehder et al. (1997) propuseram que a SP serviria como um mediador das reações imunológicas produzidas pelo estresse. Na verdade, várias regiões cerebrais implicadas em reações de defesa e ansiedade, como o hipotálamo, a amígdala, o hipocampo e a substância cinzenta periaquedatal (PAG) (SHAIKH; SIEGEL, 1994), expressam densidades significantes de receptores para NKs, além de fibras nervosas e corpos celulares imunorreativos à SP.

Estudos confirmam ainda que o efeito ansiogênico da SP é mediado por receptores NK-1, que estão localizados em várias áreas cerebrais e, especialmente, no núcleo paraventricular do hipotálamo, onde pode haver uma interação com o fator hipotalâmico de liberação da corticotrofina (CRH) e uma regulação direta do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) pela SP, que, por sua vez, poderia ser responsável pela ação lipolítica desta neurocinina (MELLO et al., 2007).

1.7 LPS

O lipossacarídeo (LPS) é uma endotoxina originária da parede celular de bactérias Gram-negativas. A presença do LPS é necessária para a função de muitas proteínas da membrana externa das bactérias (BROOKS et al., 2000). Porém, o LPS pode ser extremamente tóxico para animais. Administrações em doses menores que 1 nM já são capazes de ativar o sistema imune do animal (ADEREM; ULEVITCH, 2000).

Uma vez que o LPS entra em contato com o organismo animal, seja a partir de uma bactéria Gram-negativa, como a *Escherichia coli*, ou pela administração direta da substância, inicia-se uma série de respostas no organismo infectado. Esta endotoxina pode atuar em macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas e células endoteliais (FENTON; GOLENBOCK, 1998).

Foi verificada a presença de citocinas pró-inflamatórias no SNC de animais administrados perifericamente com o LPS, levantando a hipótese de que o mesmo poderia atuar no SNC. Em relação à funcionalidade da produção central de citocinas desencadeada pelo LPS, as hipóteses principais sugerem que esse processo possa modular a excitabilidade neuronal e processos de neurodegeneração e/ou neuroproteção (RIVEST, 2003).

As citocinas se mostraram mediadores cruciais entre o sistema imune e o SNC (QUAN; HERKENHAM, 2002) sendo também responsáveis pelas alterações comportamentais encontradas como anorexia, diminuição da exploração ambiental e social, diminuição da atividade locomotora, diminuição da memória, diminuição do comportamento sexual, dentre outras alterações características do processo inflamatório (KINOSHITA, 2007).

Dentro da área médica e veterinária, o LPS é muito utilizado nas mais diferentes linhas de pesquisa, pelo seu efeito de estímulo do sistema imunológico. É muito empregado em animais de laboratório, como roedores, por exemplo. Comercialmente e para estudos toxicológicos, neuroimunológicos, dentre outros, uma das principais fontes do LPS é a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, por meio de um processo de extração fenólica (MIMS, 1999).

2 OBJETIVOS

- Estudar se a administração de LPS ou de maropitant, isoladamente, tem capacidade de alterar a atividade motora e exploratória, avaliadas pelo teste de campo aberto, e o comportamento tipo ansioso pelo teste claro/escuro.
- Verificar se o maropitant tem capacidade de alterar a atividade motora e exploratória, bem como o comportamento tipo ansioso, em ratos expostos ao LPS.
- Estudar os efeitos isolados do maropitant e do LPS na expressão astrocitária da GFAP e se o maropitant tem o potencial de alterar essa expressão em ratos expostos ao LPS.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Para o presente estudo, foram utilizados 40 ratos Wistar adultos, machos, divididos em 4 grupos de 10 animais cada e mantidos em uma unidade livre de patógenos, com ciclo invertido 12/12, de claro/escuro, umidade padrão e temperatura de 22 a 23º C. Receberam água e ração peletizada *ad libitum*. Cinco animais foram alojados por caixa de 50x30x16cm, trocada três vezes por semana (foram mantidos no biotério uma semana antes do início dos estudos para aclimatação). Os procedimentos com animais foram aprovados de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista (protocolo 042/16).

3.2 Fármacos

- Solução salina: solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) estéril a 0,9%.
- LPS: lipopolissacarídeo obtido por extração fenólica a partir da *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma®). A concentração do LPS foi de 100µg/ml de solução salina.
- Maropitant: Cerenia® solução injetável, na concentração de 10mg/ml.

3.3 Grupos

- Grupo (SAL) - Solução salina 0,9% + Solução salina 0,9% (via intraperitoneal)
- Grupo (MAR) - Solução salina 0,9% + Maropitant (20mg/kg, via intraperitoneal)
- Grupo (LPS) - Solução salina 0,9% + LPS (100 µg/kg, via intraperitoneal)
- Grupo (LPS+MAR) - LPS (100 µg/kg, via intraperitoneal) + Maropitant (20mg/kg, via intraperitoneal)

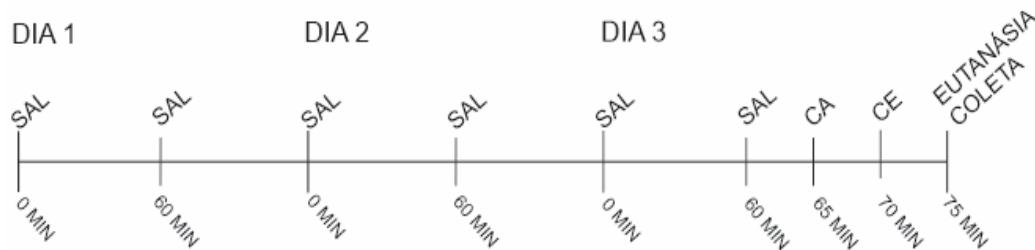
3.4 Delineamento experimental

No dia 1, foi iniciado o experimento, sendo feitas injeções intraperitoneais, com cada animal recebendo injeção com 15 minutos de diferença entre eles.

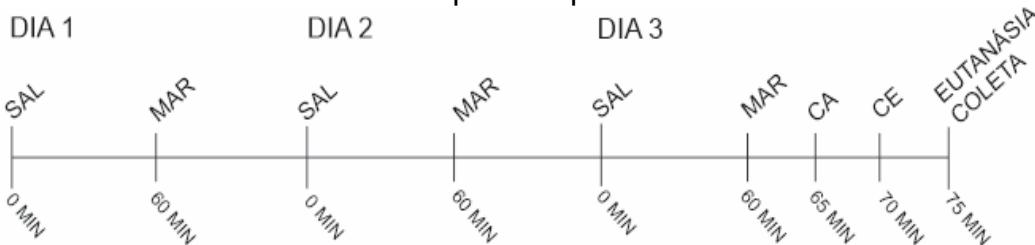
Exatamente após uma hora da primeira administração, cada animal recebeu uma segunda injeção, conforme demonstrado na Figura 1. Esse protocolo foi feito para que cada animal participante do experimento tivesse recebido ao todo duas administrações intraperitoneais por dia. No dia 2, todo o protocolo citado acima foi repetido no mesmo horário e da mesma maneira. No dia 3 do experimento, os animais de cada grupo foram submetidos ao mesmo protocolo de outros dias, porém, passada uma hora da segunda injeção, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto (CA) e claro/escuro (CE), com duração de 5 minutos cada. Após os testes, os animais foram eutanasiados, sendo coletados os encéfalos para a análise imuno-histoquímica.

Figura 1 – Representação do delineamento experimental realizado nos grupos SAL, MAR, LPS e LPS+MAR

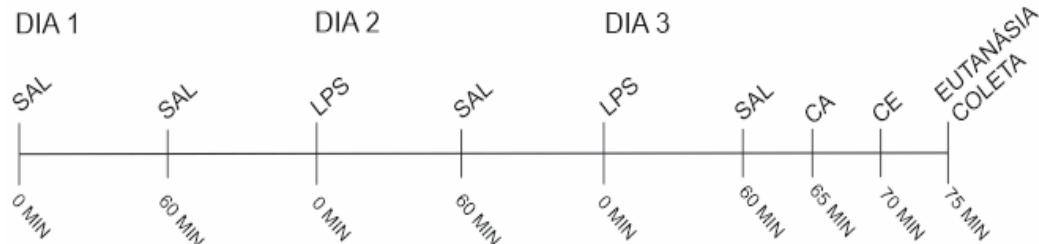
Grupo Salina



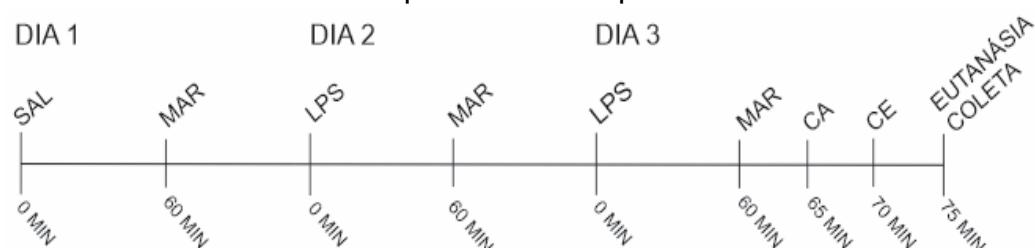
Grupo Maropitant



Grupo LPS



Grupo LPS + Maropitant



3.5 Testes comportamentais

3.5.1 Campo aberto

A atividade geral em campo aberto avalia principalmente parâmetros motores e exploratórios (PATTI et al., 2005). No teste do campo aberto, segundo alguns autores, o comportamento do animal é determinado pelo conflito entre a motivação para explorar e a aversão a lugares abertos, desprotegidos e iluminados (ASANO, 1986; CRUSIO et al., 1989). É um teste utilizado para analisar atividade e, com base nela, sugerir o estado de ansiedade em roedores. De modo coerente, drogas de perfil ansiolítico ou ansiogênico tendem, respectivamente, a aumentar ou diminuir a ambulação no campo aberto (TREIT, 1985).

O aparato utilizado para o estudo consiste de uma arena redonda de 96 centímetros de diâmetro, rodeada por uma parede de 25 cm de altura e pintada de branco, com o chão dividido em 19 partes pintadas de preto. Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena com o ambiente previamente limpo com solução álcool/água 5% para eliminar odores deixados por animais submetidos ao teste anteriormente. Permaneceram na arena por um período de 5 minutos para análise comportamental. Os animais foram analisados por um sistema de observação indireta, no qual o observador fica em uma sala separada com isolamento acústico e pouca iluminação, enquanto a sala de testes possui uma câmera instalada no teto a 100cm do aparato onde se encontra o animal. As imagens são enviadas e gravadas em um computador na sala ao lado e, posteriormente analisadas por dois observadores. Diversos padrões comportamentais foram observados durante o experimento:

- Frequência de locomoção (número de áreas cruzadas com as quatro patas);
- Autolimpeza;
- Frequência de levantar;
- Quantidade de bolos fecais.

3.5.2 Teste claro-escuro

Imediatamente após o teste de campo aberto, foi realizado o teste de transição claro/escuro. O teste de transição claro/escuro é baseado na aversão

natural dos roedores às áreas iluminadas e no comportamento exploratório espontâneo de roedores em resposta a fatores de estresse leve, isto é, ambiente novo e luminoso. O aparelho do teste consiste de um pequeno compartimento escuro seguro (um terço) e um grande compartimento aversivo iluminado (dois terços). O teste de claro/escuro pode ser útil para prever a atividade do tipo ansiolítica ou ansiogênica em roedores. Transições têm sido referidas como sendo um índice de atividade de exploração por causa da habituação ao longo do tempo. O aumento do tempo de permanência no lado escuro pode indicar comportamento do tipo ansioso (BOURIN; HASCOËT, 2003).

Utilizando o procedimento validado por Costall et al. (1989) para sensibilidade à ansiedade, os ratos foram colocados no centro do compartimento claro e mantidos por 5 minutos para livre exploração. O comportamento foi avaliado por observação indireta. Após 5 minutos de teste, os animais foram retirados e o aparato foi limpo com solução de álcool/água 5%, uma vez que sujidades retiram o componente neofóbico associado ao aparato (BOURIN; HASCOËT, 2003). Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Tempo de permanência nos compartimentos claro e escuro;
- Frequência de levantar;
- Frequência de locomoção (número de quadrados cruzados com as quatro patas).

3.6 Estudo imuno-histoquímico da expressão astrocitária de GFAP

Imediatamente após a realização do teste de transição claro/escuro foi realizada a remoção do encéfalo, o qual foi imerso em solução fixadora de formol a 10% em tampão fosfato de Sorensen (pH 7,2-7,4), a fim de se avaliar a resposta astrocitária nos distintos grupos.

As amostras permaneceram por, no máximo 72 horas na solução fixadora para posterior desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Cortes transversais de 5 μ m foram obtidos, montados em lâminas histológicas e fotografados em microscópio Olympus BHT-100.

Cortes histológicos de blocos selecionados foram colhidos em lâminas tratadas com silano (Sigma) a 4% em acetona, objetivando uma melhor aderência aos mesmos. Tais cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em série

decrescente de etanol absoluto, etanol a 95%, a 80%, a 70% e a 50% e, a seguir, fervidos durante 15 minutos em forno de micro-ondas convencional (potência máxima), imersos em tampão citrato 0,01 M (ácido cítrico 0,01 M, 1:3, pH 6,0). Depois de resfriados durante 20 minutos, a peroxidase endógena foi bloqueada, incubando-se as lâminas por 30 minutos em metanol contendo 10% de peróxido de hidrogênio 30 volumes.

Para marcação imuno-histoquímica de GFAP, o método utilizado foi o da avidina-biotina peroxidase, sendo cada procedimento intercalado por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato.

Os cortes foram, então, incubados, durante 16 horas a 4ºC em câmara úmida, com o anticorpo monoclonal primário anti-GFAP (Rabbit anti-cow GFA, code number ZO334, Dako), padronizado na diluição 1:1000, a qual, por prévia titulação, foi considerada a mais adequada. Para tal diluição foi utilizada solução contendo soro-albumina bovina a 5% em água destilada (1,25mL), azida sódica a 5% em água destilada (2,5mL) e solução salina tamponada (59mL).

Posteriormente, foi realizada a incubação dos cortes por 30 minutos com anticorpo secundário anti-imunoglobulinas de coelho (Universal LSABTM 2Kit/ HRP, Rb / Mo, K0609-1 Dako) na diluição 1:400 e, após aplicação por 30 minutos do conjugado estreptavidina-biotina-peroxidase, diluído em solução salina tamponada com fosfato (Universal LSABTM 2 Kit / HRP, Rb/ Mo, Dako).

A imunorreatividade foi visualizada pela aplicação sobre os cortes de diaminobenzidina (DAB, Sigma) a 0,1% como cromógeno e peróxido de hidrogênio a 0,5%. Os cortes foram contra corados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética sob lamínula. Todas as reações foram acompanhadas por lâminas controle negativo, submetidas a todas as etapas do procedimento, porém suprimindo-se a aplicação do anticorpo primário.

3.7 Quantificação da reatividade astrocitária de GFAP

Todos os cortes submetidos à prova imuno-histoquímica foram analisados, em microscopia de luz (com objetiva de 40x), para identificação e avaliação da distribuição e do comportamento morfológico das células marcadas para GFAP (coradas em castanho). Dez microfotografias de cada corte do cortex frontal foram retiradas aleatoriamente com o mesmo microscópio, usando a objetiva de 40x. A

área de processos de astrócitos, marcados em marrom, foi calculada automaticamente em pixels usando o software Image ProPlus 6.0, que foi calibrado com filtros de cores digitais que regulam vermelho, verde, e azul, de tal modo que apenas as células positivas foram incluídas e a coloração de fundo excluída da mensuração.

3.8 Análise estatística

Para os dados paramétricos foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e o nível de significância de $p < 0,05$ foi considerado o mínimo suficiente para mostrar diferenças significativas. As análises estatísticas foram realizadas pelo software Prism.

4 RESULTADOS

Não houve mortalidade nos animais tratados com as doses e os medicamentos utilizados neste estudo. Todos os testes comportamentais foram gravados e os vídeos foram analisados por dois observadores.

No campo aberto, foram analisados os parâmetros de frequência de locomoção, frequência de levantar, autolimpeza e número de bolas fecais, respectivamente representados nas Figuras 2, 3, 4 e 5.

No parâmetro frequência de locomoção, demonstrado na Figura 2, o número de áreas percorridas diminuiu nos grupos LPS e LPS+MAR em relação aos grupos SAL e MAR. Foram observadas diferenças significantes entre os grupos SAL vs. LPS e SAL vs. LPS+MAR ($p<0,05$) e entre os grupos MAR vs. LPS e MAR vs. LPS+MAR ($p<0,001$). Não foi encontrada diferença significante entre LPS vs. LPS+MAR.

A Figura 3 ilustra os resultados do parâmetro frequência de levantar, em que o grupo SAL permaneceu mais tempo sobre os membros posteriores do que o grupo LPS e LPS+MAR, com diferença significante de $p<0,001$ e $p<0,0001$, respectivamente. Nesse parâmetro houve diferença ($p<0,05$) entre os grupos LPS vs. LPS+MAR.

Foi observado no parâmetro autolimpeza, representado na Figura 4, que o grupo MAR permaneceu mais tempo realizando “autolimpeza” do que o grupo LPS, com diferença estatística de $p<0,05$.

O número de bolas fecais foi contado no final dos 5 minutos do teste, sendo detectado que o grupo LPS teve contagem de bolas fecais显著mente maior ($p<0,0001$) do que os grupos SAL, MAR e LPS+MAR (Figura 5).

No teste de claro/escuro, representado na Figura 6, os grupos MAR e LPS permaneceram menos tempo no lado claro do que o grupo SAL, com diferença significante, respectivamente, de $p<0,0001$ e $p<0,05$. Por sua vez, os grupos MAR e LPS permaneceram menos tempo no escuro do que o grupo LPS+MAR, com diferença significante de $p<0,0001$ e $p<0,001$, respectivamente.

Os resultados do parâmetro frequência de levantar no teste claro/escuro apresentaram resultados semelhantes aos encontrados no campo aberto (Figura 7).

No parâmetro de frequência de locomoção no teste claro/escuro, o grupo LPS apresentou redução quando comparado aos grupos SAL e MAR, com diferença,

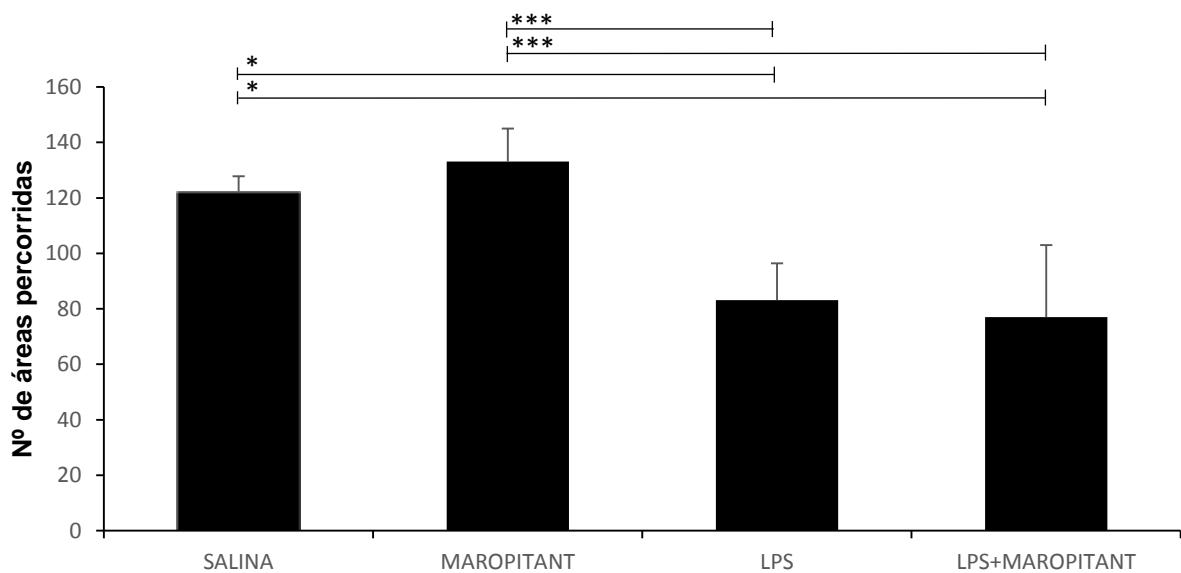
respectivamente, de $p<0,01$ e $p<0,001$. O grupo LPS+MAR teve o menor desempenho nesse parâmetro, com diferença de $p<0,001$ em relação ao grupo LPS e $p<0,0001$ entre os demais grupos (Figura 8).

A expressão do marcador de astrócitos GFAP (representada na contagem total de pixels) na região do córtex frontal pode ser visualizada na Figura 9. Pode-se observar que houve um aumento da expressão astrocitária nos grupos LPS e LPS+MAR em relação aos demais grupos, com diferença significante quando comparado aos grupos SAL e MAR. O grupo LPS+MAR teve menor contagem de pixels que o grupo LPS, com diferença significante de $p<0,05$. A imunocoloração astrocitária para GFAP dos diferentes grupos no córtex frontal está representada na Figura 10.

4.1 Campo aberto

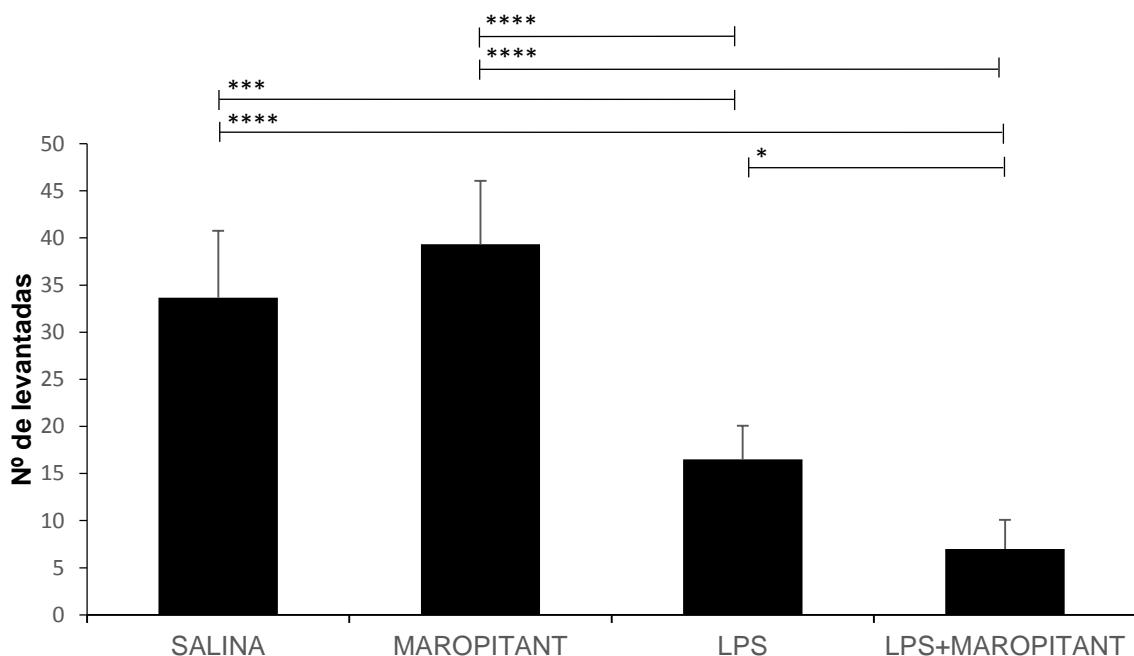
4.1.1 Frequência de locomoção

Figura 2 – Número de áreas percorridas no teste do campo aberto (como média ± desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR., * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$



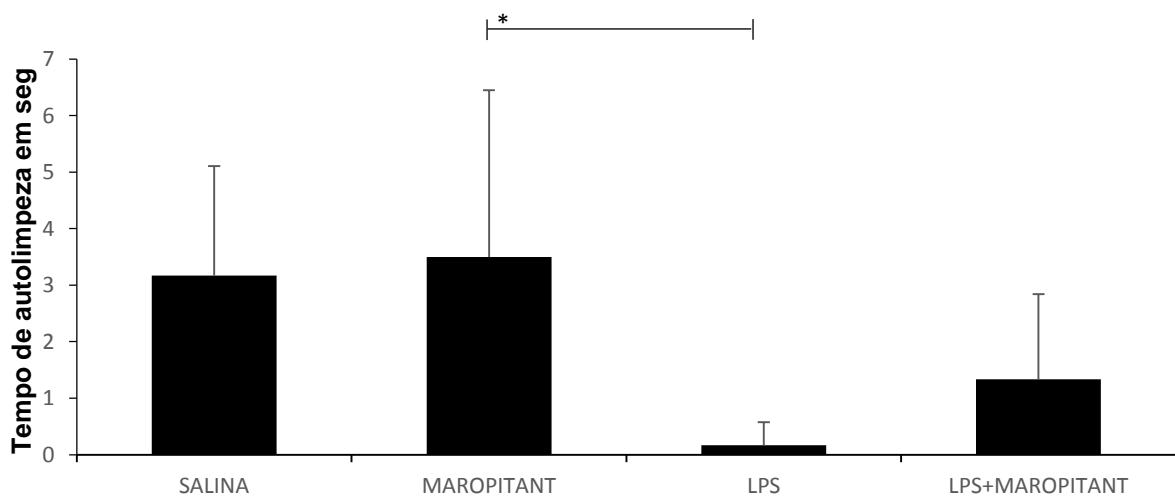
4.1.2 Frequência de levantar

Figura 3 – Número de vezes que o animal permaneceu ereto sobre suas patas traseiras com suas patas dianteiras no ar (como média ± desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. * $p<0,05$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$



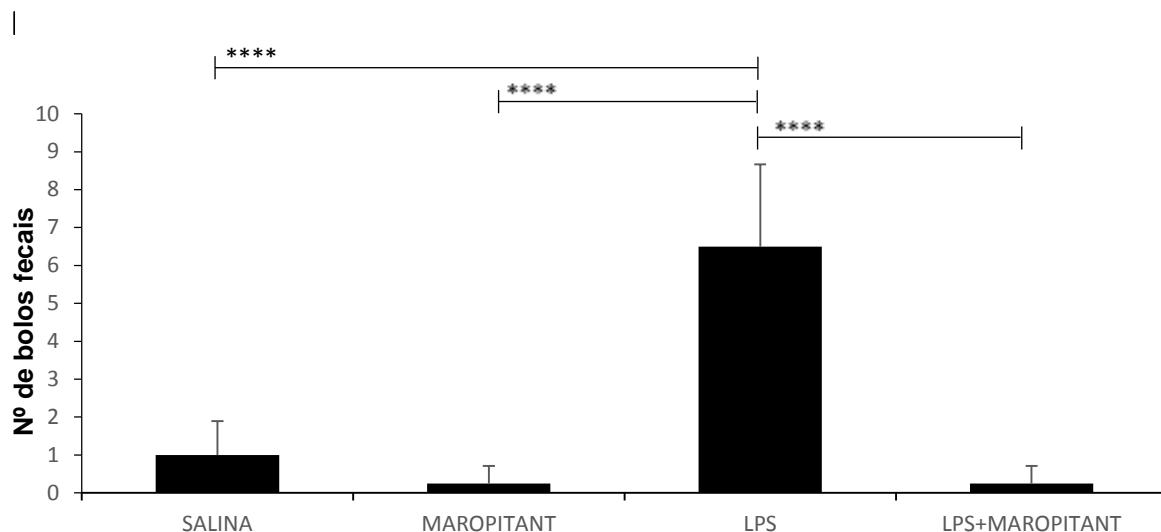
4.1.3 Autolimpeza

Figura 4 – Tempo médio gasto com autolimpeza (como média ± desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR.* $p<0,05$



4.1.4 Bolos fecais

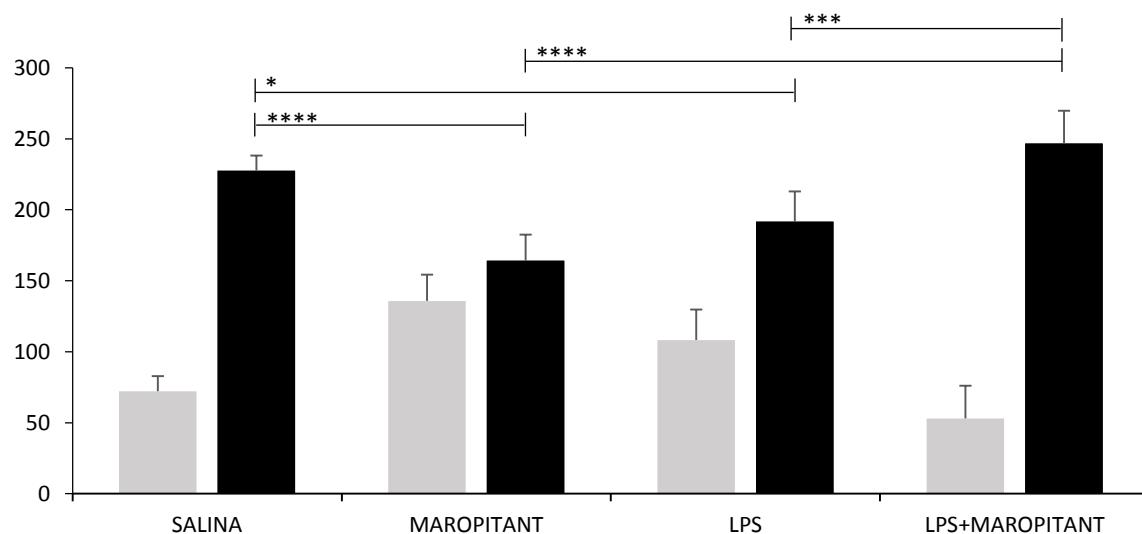
Figura 5 – Número de bolos fecais (como média \pm desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. *** p<0,0001



4.2 Teste Claro/Escuro

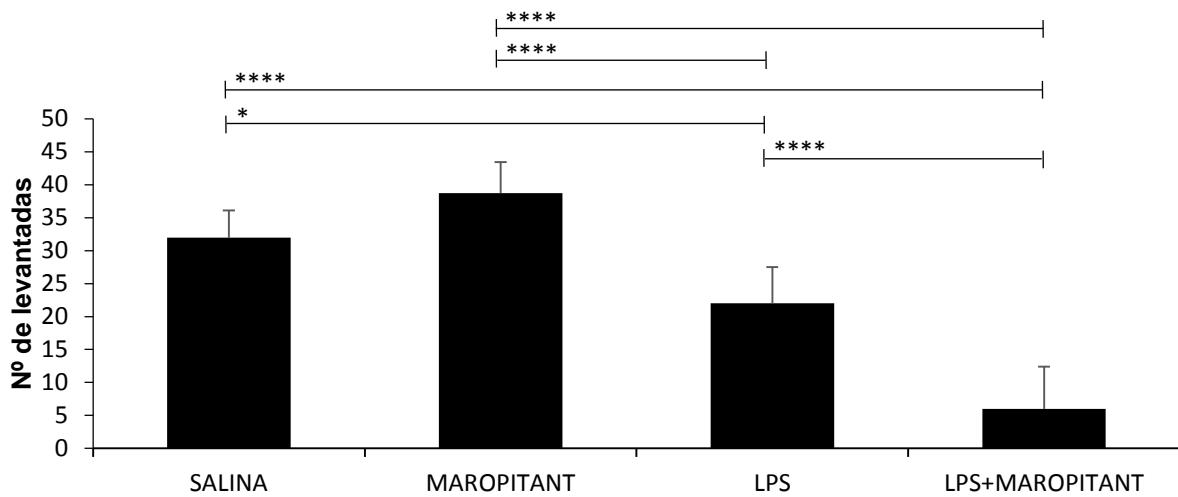
4.2.1 Tempo de permanência no claro/escuro

Figura 6 – Tempo de permanência no lado claro/escuro. A barra branca indica o tempo em que o animal permaneceu no lado claro, enquanto a barra preta representa o tempo que o animal permaneceu no lado escuro (como média \pm desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. * p<0,05; *** p<0,001; **** p<0,0001



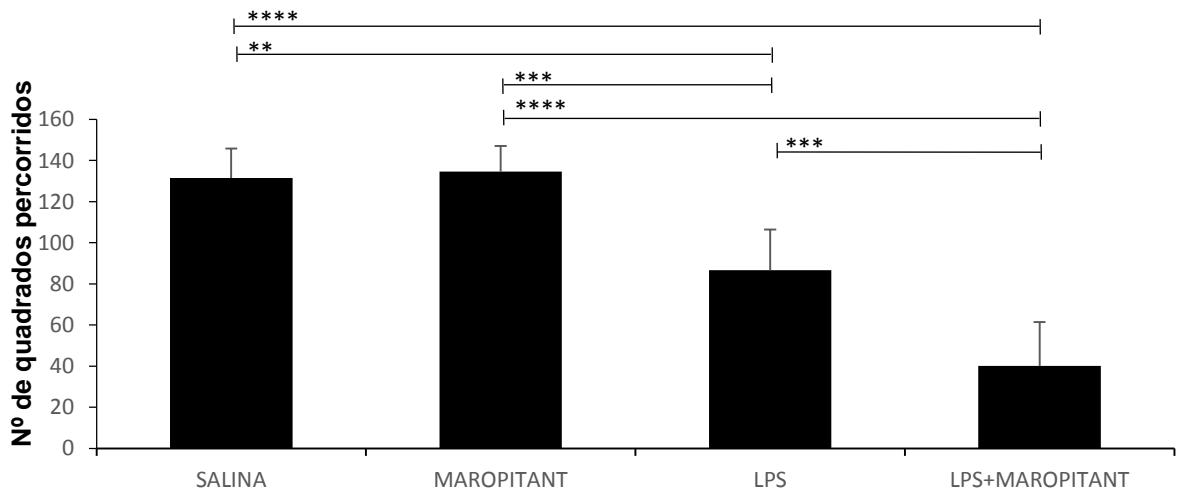
4.2.2 Frequência de levantar

Figura 7 – Número de vezes que o animal permaneceu ereto sobre suas patas traseiras com suas patas dianteiras no ar no teste do claro/escuro (como média \pm desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. * $p<0,05$; *** $p<0,0001$



4.2.3 Frequência de locomoção

Figura 8 – Número de quadrados percorridos no teste do claro/escuro (como média \pm desvio padrão) nos diferentes grupos. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. ** $p<0,01$; ***; $p<0,001$; **** $p<0,0001$



4.3 GFAP

Figura 9 – Contagem total em pixels de imunoreatividade de GFAP em astrócitos (representados como média ± desvio padrão) no córtex frontal dos diferentes grupos experimentais. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001

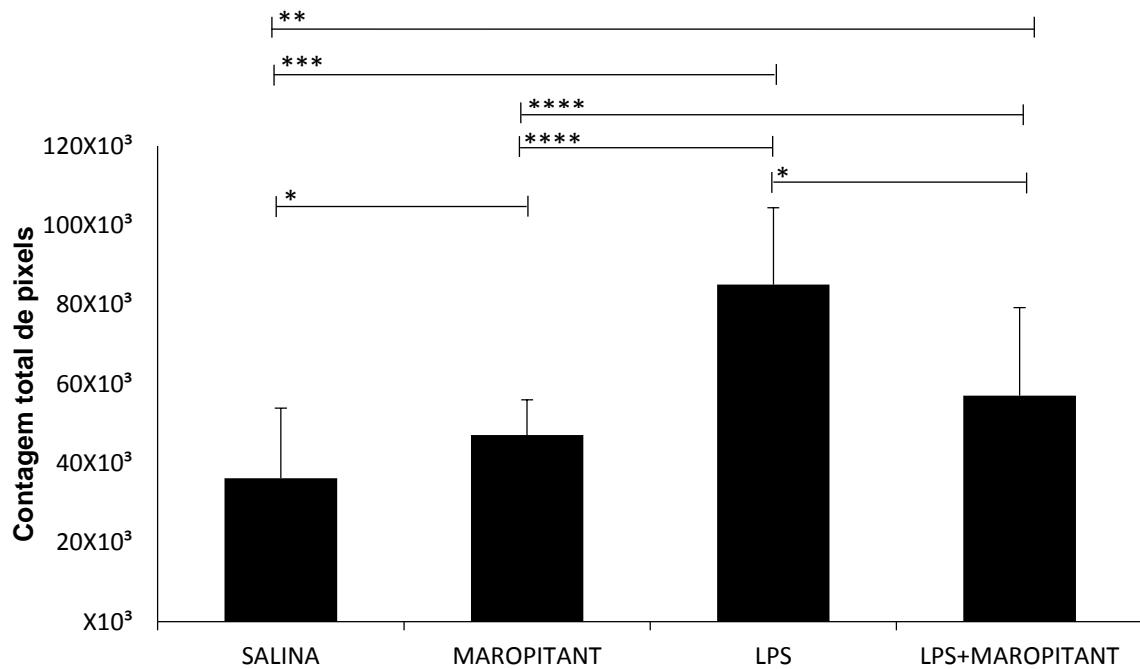
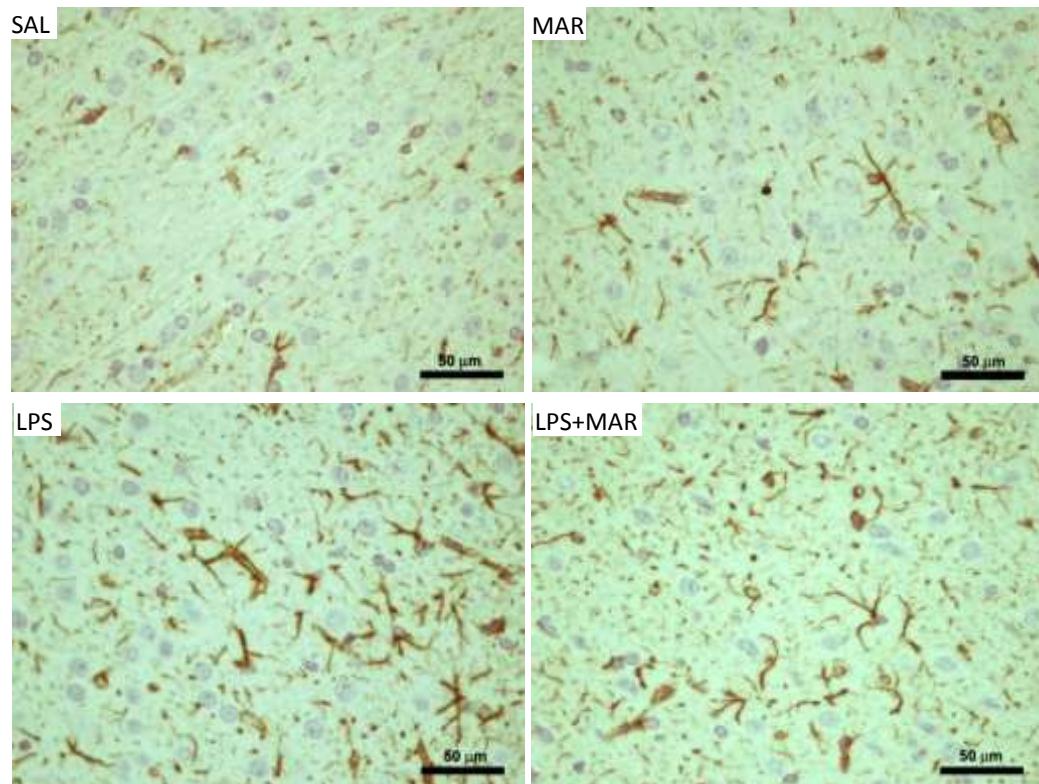


Figura 10 – Imunocoloração astrocitária para GFAP no córtex frontal dos diferentes grupos experimentais. SAL; MAR; LPS e LPS+MAR. Obj. 40x



5 DISCUSSÃO

A substância P é um neuropeptídio amplamente distribuído no SNC e SNP, ligando-se ao NK-1r. A SP altera diversas funções, como a regulação da sobrevivência neuronal, assim como as funções cardiovascular e respiratória, estando ainda envolvida na ativação do reflexo emético (DIEMUNSCH; GRELOT, 2000; MANTYH, 2002; MUÑOZ et al., 2014). Na medula espinhal, a SP participa na neurotransmissão da dor a estímulos nocivos e modula reflexos autonômicos, incluindo o reflexo de micção. No SNP, a SP é localizada nos neurônios sensoriais primários e nos neurônios intrínsecos dos sistemas digestório, respiratório e genitourinário (MAGGI, 2000). A SP também está relacionada com uma série de processos como a regulação do estresse, o comportamento afetivo e a ansiedade. Estudos recentes mostraram que alguns estressores emocionais aumentam o nível de SP nas áreas do sistema límbico, como a amígdala e o septum, causando um comportamento tipo ansioso (EBNER et al., 2008; BASSI et al., 2014).

Um estudo demonstrou que a injeção de SP e um agonista do receptor NK-1 nos núcleos da amígdala de ratos ou por injeção intraperitoneal potencializou o comportamento tipo ansioso no teste do labirinto elevado, mostrando que a ativação dos receptores NK-1 pode estar envolvida no comportamento tipo ansioso (DUZIONNI et al., 2008).

Ayanwuyi et al. (2015) mostraram que a injeção do antagonista do receptor NK-1 na amígdala de ratos diminuiu o comportamento tipo ansioso em ratos no teste do labirinto elevado. Michelson et al. (2013), porém, mostraram com um estudo clínico randomizado duplo cego que pacientes diagnosticados com desordem de ansiedade e tratados com um antagonista do receptor NK-1 não tiveram diferença significativa em relação ao grupo placebo.

Estudos demonstraram que os antagonistas de NK-1r podem ter ação antidepressiva, mas não ansiolítica no campo aberto (MALKESMAN et al., 2007). Entretanto, existem evidências que confirmam e ampliam o potencial terapêutico dos antagonistas dos receptores NK-1 para o tratamento da ansiedade no teste do campo aberto (VENDRUSCOLO et al., 2003).

É reconhecido que a SP é capaz de excitar neurônios gabaérgicos na amígdala de camundongos via ativação de receptores NK-1, contribuindo para a ação ansiogênica da SP (SOSULINA et al., 2015).

No teste do campo aberto deste estudo, foram analisados diversos parâmetros. Pode-se observar que o grupo LPS teve os parâmetros frequência de locomoção e frequência de levantar reduzidos em relação aos grupos SAL e MAR, o que já era esperado, uma vez que outros trabalhos demonstraram haver redução desses parâmetros em animais tratados com LPS (KOZAK et al., 1994; ENGELAND et al., 2001; KINOSHITA, 2007 SWIERGIEL et al., 2007). O grupo LPS+MAR não teve melhora nos resultados em relação ao LPS, mostrando que o maropitant não teve efeito como tratamento na redução da atividade exploratória em ratos expostos ao LPS. A possibilidade de o maropitant ter causado algum tipo de estímulo nociceptivo durante a aplicação, o que justificaria o resultado, deve ser descartada, já que o grupo MAR teve frequência de locomoção preservada.

A autolimpeza tem sido considerada como um estilo de *coping* comportamental ou enfrentamento (esforços cognitivos e comportamentais para lidar com situações de ameaça ou desafio quando não está disponível uma resposta automática) a desafios estressantes/ansiogênicos (SPRUIJT et al., 1992). Estudos mostraram que a injeção de SP em ratos induziu a uma autolimpeza excessiva e com padrões diferentes assim como outros peptídeos (MEISENBERG; SIMMONS, 1986; VAN WIMERSMA GREIDANUS; MAIGRET, 1988).

Pode-se observar que o grupo LPS teve o tempo de autolimpeza bem reduzido em comparação ao grupo MAR. Apesar de diversas evidências mostrarem que a SP tem capacidade de alterar esse comportamento, não tivemos diferenças significantes nos grupos tratados com seu antagonista.

Torihashi et al. (2000) mostraram que o LPS pode causar desordens de motilidade na região do íleo devido à ativação dos macrófagos residentes na musculatura intestinal. Tais macrófagos expressam e ativam os genes iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e cicloxigenase 2 (COX2), aumentando a produção de óxido nítrico (NO) e reduzindo a contração do músculo liso. Os resultados sugerem que os macrófagos residentes na camada muscular induziram iNOS como parte da reação inflamatória estimulada pelo LPS, afetando a contração do músculo liso e iniciando a resposta imune nessa camada. O NO está envolvido na estimulação da secreção gastrointestinal por mecanismos dependentes de prostaglandinas, podendo inibir as contrações segmentares no cólon, porém promovendo efeito laxante (JAFRI; PANKAI, 2003).

A SP exerce no músculo liso de todas as áreas do trato digestivo um forte efeito excitatório, que é direto ou retransmitido pelos neurônios colinérgicos. Numerosos dados eletrofisiológicos, farmacológicos e imuno-histoquímicos levam à conclusão de que a substância P é liberada por neurônios intrínsecos do trato digestivo ou por nervos extrínsecos. A SP participa no reflexo peristáltico intestinal pela ativação das células musculares lisas do intestino e está envolvida na gênese de uma atividade excitadora ascendente não colinérgica, que, provavelmente, ocorre durante o vômito (NIEL, 1991).

A estimulação do receptor NK-2 evoca um efeito excitatório puro sobre a motilidade colônica, enquanto a estimulação do receptor NK-1 induz efeitos excitatórios e inibitórios (LECCI et al., 1997)

Os receptores neuronais NK-1 ou NK-2 exercem um freio inibitório na motilidade, embora esses receptores pareçam operar em diferentes contextos. Em geral, os resultados obtidos em seres humanos indicam que antagonistas de NK-1r poderiam ser úteis em distúrbios de motilidade caracterizados pela constipação, enquanto os antagonistas de NK-2r poderiam ser testados em distúrbios caracterizados por diarreia ou constipação (LECCI et al., 2008).

Um estudo mostrou que a administração de doses anti-eméticas de aprepitant (um antagonista de NK-1r) não altera a propulsão gastrointestinal ou colônica em voluntários saudáveis (MADSEN et al., 2008). Já Mikawa et al. (2015) observaram que o maropitant inibiu a motilidade neurogênica provocada pela pressão luminal em um modelo de íleo pós-operatório, sugerindo que o maropitant induziu distúrbio da motilidade no íleo e cólon *ex vivo* e *in vivo* em ratos.

Em nosso estudo foi visto que o grupo LPS teve contagem de bolos fecais significativamente maior ($p<0.001$) do que os grupos SAL, MAR e LPS+MAR e que o grupo LPS+MAR teve esse parâmetro diminuído em relação ao grupo LPS.

Os aspectos do papel da SP sobre a fisiologia do trato gastrointestinal são relativamente bem estudados, mostrando a SP como co-neurotransmissor em neurônios excitatórios e como mediador nas funções motoras e secretórias digestivas. Outras facetas importantes da SP são reveladas em estados patológicos. O papel pró-inflamatório da SP demonstra que seus antagonistas são um potencial terapêutico atraente em condições autoimunes e infecciosas do trato gastrointestinal. A SP tem um papel fundamental na inflamação neurogênica e nos

mecanismos de dor, o que se mostra altamente relevante nas condições do trato gastrointestinal (VILISAAR; ARSENESCU, 2016).

Estudos mostraram que antagonistas de NK-1r, como SR140333, foram investigados pelo seu potencial uso no alívio para sintomas de alergia alimentar, síndrome do intestino irritável (SII) e doença intestinal inflamatória (DII), tendo atividade antissecretria e antidiarreica (MORIARTY et al., 2001). O papel das taquicininas na dor abdominal foi observado em um estudo piloto duplo-cego, no qual o antagonista de NK-1r CJ-11.974 aliviou o desconforto associado com a distensão rectosigmoidal em pacientes com SII (LEE et al., 2000). Tough et al. (2003) demonstraram que o antagonista de NK-1r DNK333 pode ser de potencial interesse terapêutico no tratamento da SII e DII e que a ativação de receptores NK-1 pode estimular o transporte de íons na mucosa intestinal.

No teste de claro/escuro, o grupo SAL permaneceu mais tempo no lado escuro do que os grupos MAR e LPS. Por sua vez, os grupos MAR e LPS permaneceram menos tempo no escuro do que o grupo LPS+MAR. O aumento do tempo de permanência no lado escuro pode indicar comportamento do tipo ansioso (BOURIN; HASCOËT, 2003).

O teste de claro/escuro é baseado na aversão natural dos roedores às áreas iluminadas, portanto os animais naturalmente tendem a ficar no escuro. A permanência no lado claro indica atividade ansiolítica e no lado escuro, efeito ansiogênico. Em nosso estudo, o maropitant demonstrou aparentemente atividade ansiolítica, porém não teve capacidade de alterar o comportamento doentio causado pelo LPS.

Danos ao SNC, infecções e estados de dor intensa levam à hipertrofia tanto da micróglia quanto dos astrócitos (astrogliose), com o aumento concomitante da produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e outras substâncias (MCMAHON et al., 2005).

Embora o GFAP seja um marcador confiável para astrócitos reativos, a maioria dos astrócitos no SNC saudável não exibe níveis detectáveis de GFAP (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Como tal, a expressão elevada de GFAP é uma das características primárias associadas a astrócitos reativos no contexto de lesão e inflamação (BURDA; SOFRONIEW, 2014). A astrogliose reativa é uma resposta a um espectro de mudanças, incluindo ganho e perda de função astrocítica,

dependente do tipo e da gravidade da injúria e pode resultar em benefícios ou prejuízos sobre o tecido neural circundante. Na astrogliose severa, os astrócitos reativos invadem domínios individuais dos astrócitos vizinhos, com a formação de uma cicatriz glial (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Pekny et al. (2016) propuseram duas vias de astrogliopatias: a astrogliose reativa, na qual os astrócitos podem ter função neuroprotetora, e um segundo caminho, caracterizado como astrocitopatia, que inclui degeneração, com perda de função e remodelação patológica de astrócitos. As consequências dessas mudanças morfológicas e bioquímicas incluem a incapacidade de mediar a homeostase do glutamato nas sinapses, com redução de moléculas de sinalização e fatores tróficos, metabolismo de glicose alterado, entre outros problemas.

Mudanças na expressão de GFAP podem ser observadas em doenças neuropsiquiátricas, incluindo depressão, ansiedade, esquizofrenia e uso de drogas e substâncias. Kim et al. (2017, no prelo) observaram diminuição da expressão astrocitária na depressão, no estresse e na ansiedade crônica, porém aumento na esquizofrenia. Dessa forma, relatam que essa expressão varia amplamente em resposta a diferentes drogas e situações.

De acordo com nossos resultados, nos grupos LPS e LPS+MAR houve um aumento da expressão astrocitária quando comparados ao grupo SAL e MAR. O grupo LPS+MAR teve contagem de pixels menor que o grupo LPS, sugerindo possível efeito de atenuação sobre a astrogliose induzida pelo LPS.

Diversos estudos têm demonstrado que o LPS exibe capacidade de alterar a expressão dos astrócitos *in vitro* e *in vivo*. Tarassishin et al. (2014) observaram que culturas de astrócitos de camundongos respondem de forma robusta ao LPS. Sun et al. (1995) demonstraram que tal ativação induzida pelo LPS está provavelmente relacionada ao aumento de IL-1 β . Outro estudo evidencia que o NO desempenha um papel fundamental na regulação da expressão do GFAP em astrócitos estimulados por LPS. Da mesma forma, a injeção de LPS no estriado causou uma marcação positiva de GFAP (BRAHMACHARI et al., 2006).

Foi descrito que a administração de diversas drogas antagonistas de NK-1r, como NAT e L-733, tem a capacidade de proteger neurônios dopaminérgicos, manter a integridade da BHE preservada, reduzir a neuroinflamação e melhorar a função motora. Além disso, diminuíram a expressão de GFAP (THORNTON et al., 2012; TUMATI et al., 2012). Em nosso estudo, o maropitant manteve inalterada essa

expressão em relação ao grupo SAL, porém teve a capacidade de reduzir a expressão astrocitária no grupo que recebeu LPS e foi tratado com a droga.

De forma resumida, pode-se perceber que os animais expostos ao modelo do LPS tratados com o maropitant aparentemente apresentaram potencialização do comportamento doentio induzido por tal modelo conforme visto nos parâmetros frequência de locomoção e frequência de levantar. O maropitant administrado em animais que receberam LPS determinou ainda significativa redução da defecação como observado pelo número de bolos fecais produzidos pelo grupo LPS+MAR em relação ao grupo LPS.

A administração isolada do maropitant determinou menor tempo de permanência dos animais no lado escuro no teste claro/escuro, sugerindo possível efeito ansiolítico da droga. No grupo exposto ao modelo de LPS e tratado com o maropitant, porém, houve aumento dessa permanência no lado escuro, mostrando reversão desse efeito quando em associação a um comportamento doentio ou até uma exarcação desse comportamento.

Quanto à expressão astrocitária de GFAP, observou-se que o maropitant foi capaz de amenizar a astrogliose induzida pelo LPS. Ainda que nos grupos LPS e LPS+MAR tenha existido aumento da expressão astrocitária em comparação aos grupos SAL e MAR, observou-se que o grupo LPS+MAR teve redução dessa expressão em relação aos animais expostos ao modelo do LPS.

6 CONCLUSÕES

- Os animais expostos ao modelo do LPS apresentaram diminuição da atividade exploratória, aumento da defecação e aumento da expressão astrocitária de GFAP.
- O maropitant administrado aos animais expostos ao LPS não afetou o comportamento doentio induzido pelo mesmo.
- O maropitant administrado em animais que receberam LPS determinou significativa redução da defecação, conforme observado pelo número de bolos fecais produzidos.
- A administração isolada do maropitant determinou menor tempo de permanência dos animais no lado escuro no teste claro/escuro, sugerindo possível efeito ansiolítico da droga. No grupo exposto ao LPS e tratado com maropitant, porém, houve aumento dessa permanência no lado escuro, não corroborando o resultado encontrado com a droga isoladamente.
- Quanto à expressão astrocitária de GFAP, observou-se que o maropitant foi capaz de atenuar a astrogliose induzida pelo LPS.

REFERÊNCIAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782-787, 2000.
- ALVAREZ, J. I.; CAYROL, R.; PRAT, A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, p. 252-264, 2011.
- ASANO, Y. Characteristics of open field behavior of Wistar and Sprague-Dawley rats. **Jikken Dobutsu. Experimental Animals**, v. 35, p. 505-508, 1986.
- AYANWUYI, L. O.; STOPPONI, S.; UBALDI, M. et al. Neurokinin 1 receptor blockade in the medial amygdala attenuates alcohol drinking in rats with innate anxiety but not in Wistar rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, p. 5136-5146, 2015.
- BALASKÓ, M.; SZÉKELY, M.; SZELÉNYI, Z. The effect of CP-96,345, a non-peptide substance P antagonist, on thermoregulation and the development of endotoxin-fever in rats. **Journal of Thermal Biology**, v. 25, p. 1-4, 2000.
- BASSI, G. S.; DE CARVALHO, M. C.; BRANDÃO, M. L. Effects of substance P and Sar-Met-SP, a NK1 agonist, in distinct amygdaloid nuclei on anxiety-like behavior in rats. **Neuroscience Letter**, v. 569, p. 121-125, 2014.
- BOSCAN, P.; MONNET, E.; MAMA, K.; TWEDT, D. C.; CONGDON, J.; STEFFEY, E.P. Effect of maropitant, a NK-1 receptor antagonist, on anesthetic requirements during noxious visceral stimulation of the ovary in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 1576-1579, 2011.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 55-65, 2003.
- BRAHMACHARI, S.; FUNG, Y. K.; PAHAN, K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 4930-4939, 2006.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Estrutura celular. In: BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. (Ed.). **Jawetz, Melnick & Adelberg: Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 6-30.
- BURDA, J. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. **Neuron**, v. 81, p. 229-248, 2014.
- COMPAN, V.; SCEARCE-LEVIE, K.; CROSSON, C.; DASZUTA, A.; HEN, R. Enkephalin contributes to the locomotor stimulating effects of 3,4-methylenedioxymethylamphetamine. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 383-390, 2003.
- CONDER, G. A.; SEDLACEK, H. S.; BOUNCHER, J. F.; CLEMENCE, R. G. Efficacy and safety of maropitant, a selective neurokinin 1 receptor antagonist, in two

randomized clinical trials for prevention of vomiting due to motion sickness in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 51, p. 528-532, 2008.

COOKE, H. J.; FOX, P.; ALFERES, L.; FOX, C. C.; WOLFE, S. A. Jr. Presence of NK1 receptors on a mucosal-like mast cell line, RBL-2H3 cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 76, p. 188-193, 1998.

COSTALL, B.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; TOMKINS, D. M. Exploration of mice in a black and white box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 32, p. 777-785, 1989.

CRUSIO, W. E.; SCHWEGLER, H., VAN ABEELEN, J. H. Behavioral responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice. I. Quantitative-genetic analysis of behavior in the open-field. **Behavioural Brain Research**, v.32, p. 75-80, 1989.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain, Behavior, and Immunity**, v.15, p.7-24, 2001.

DELLAGIOIA, N.; HANNESTAD, J. A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, p.130-143, 2010.

DIEMUNSCH, P.; GRELOT, L. Potential of substance P antagonists as antiemetics. **Drugs**, v. 60, p. 533-546, 2000.

DONKIN, J. J.; VINK, R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. **Current Opinion in Neurology**, v. 23, p. 293-299, 2010.

DUZZIONI, M.; CALIXTO, A. V.; DUARTE, F. S.; DE LIMA, T. C. Modulation of anxiety in rats evaluated in the elevated T-maze: evidence of the relationship between substance P and diazepam. **Behavioural Brain Research**, v. 187, p. 140-145, 2008.

EBNER, K.; MUIGG, P.; SINGEWALD, G.; SINGEWALD, N. Substance P in stress and anxiety. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1, p. 61-73, 2008.

ENGELAND, C. G.; NIELSEN, D. V.; KAVALIERS, M.; OSSENKOPP, K. P. Locomotor activity changes following lipopolysaccharide treatment in mice: a multivariate assessment of behavioral tolerance. **Physiology & Behavior**, v. 72, p. 481-491, 2001.

FEHDER, W. P.; SACHS, J.; UVAYDOVA, M.; DOUGLAS, S. D. Substance P as immune modulator of anxiety. **Neuroimmunomodulation**, v. 4, p. 4248, 1997.

FENTON, M. J.; GOLENBOCK, D. T. LPS-binding proteins and receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, p. 25-32, 1998.

FENTON, M. J.; GOLENBOCK, D. T. Lps-binding proteins and receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, p. 25-32, 1998.

GAVIOLI, E. C.; CANTERAS, N. S.; DE LIMA, T. C. M. The role of lateral septal NK1 receptors in mediating anxiogenic effects induced by intracerebroventricular injection of substance P. **Behavioural Brain Research**. v. 134, p. 411-415, 2002.

GOMES, F. C. A.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 619-631, 1999.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 811-829, 1994.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Review: Substance P. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 555-576, 2001.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 12, p. 123-137, 1988.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The Blood-Brain Barrier / Neurovascular Unit in Health and Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 173-185, 2005.

HO, W. Z.; LAI, J. P.; ZHU, X. H.; UVAYDOVA, M.; DOUGLAS, S. D. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. **Journal of Immunology**, v. 159, p. 5654-5660, 1997.

HOLZER, P.; HOLZER-PETSCHE, U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. **Pharmacology Therapy**, v. 73, p. 219-263, 1997.

JAFRI, S.; PANKAI, P. J. Agentes utilizados para diarréia, prisão de ventre e doença inflamatória intestinal agentes utilizados para doença biliar e pancreáticaIn: **Gilman AG As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. São Paulo: MacGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003. p.781-795.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária. Sistema Nervoso**. Barueri: Manole, 2000, p. 1281-1282.

KARAGIANNIDES, I.; TORRES, D.; TSENG, Y. H.; BOWE, C.; CARVALHO, E.; ESPINOZA, D.; POTHOUAKIS, C.; KOKKOTOU, E. Substance P as a novel antiobesity target. **Gastroenterology**, v. 134, p. 747-755, 2008.

KENT, S.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Effects of lipopolysaccharide on food-motivated behavior in the rat are not blocked by an interleukin-1 receptor antagonist. **Neuroscience Letters**, v. 145, p. 83-86, 1992.

KIM, R.; HEALEY, K. L.; SEPULVEDA-ORENGO, M. T.; REISSNER, K. J. Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: From astrocytopathy to astrogliosis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2017. (no prelo)

KINOSHITA, D. **Avaliação dos efeitos do LPS sobre parâmetros comportamentais e imunológicos em camundongos idosos.** 2007 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KINOSHITA, D.; COHN, D. W.; COSTA-PINTO, F. A.; DE SA-ROCHA, L. C. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. **Physiology & Behavior**, v. 96, p. 328-332, 2009.

KOZAK, W.; CONN, C. A.; KLUGER, M. J. Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 125-135, 1994.

KRAUSE, J. E.; DIMAGGIO, D. A.; MCCARSON, K. E. Alterations in neurokinin 1 receptor gene expression in models of pain and inflammation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 854-859, 1995.

LAI, J. P.; DOUGLAS, S. D.; HO, W. Z. Human lymphocytes express substance P and its receptor. **Journal of Neuroimmunology**, v. 86, p. 80-86, 1998.

LARSEN, P. J.; JESSOP, D.; PATEL, H.; LIGHTMAN, S. L.; CHOWDREY, H. S. Substance P inhibits the release of anterior pituitary adrenocorticotrophin via a central mechanism involving corticotrophinreleasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Journal of Endocrinology**, v. 5, p. 99-105, 1993.

LARSON, S J.; DUNN, A. J. Behavioral effects of cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 15, p. 371-387, 2001.

LECCI, A.; ALTAMURA, M.; CAPRIATI, A.; MAGGI, C. A. Tachykinin receptors and gastrointestinal motility: focus on humans. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 12 (Suppl 1), p. 69-80, 2008.

LEE, O. Y.; MUNAKATA, J.; NALIBOFF, B. D.; CHANG, L.; MAYER, E. A. A double blind parallel group pilot study of the effects of CJ- 11,974 and placebo on perceptual and emotional responses to rectosigmoid distension in IBS patients. **Gastroenterology**, v. 118, A846, 2000.

LEE, S. K.; PI, S. H.; KIM, S. H.; MIN, K. S.; LEE, H. J.; CHANG, H. S.; KANG, K. H.; KIM, H. R.; SHIN, H. I.; LEE, S. K.; KIM, E. C. Substance P regulates macrophage inflammatory protein 3alpha/chemokine C-C ligand 20 (CCL20) with heme oxygenase-1 in human periodontal ligament cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 150, p. 567-575, 2007.

LIBERTO, C. M.; ALBRECHT, P. J.; HERX, L. M.; YONG, V. W.; LEVISON, S. W. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, p. 1092-1100, 2004.

LONGMORE, J.; HILL, R. G.; HARGREAVES, R. J. Neurokinin-receptor antagonists: pharmacological tools and therapeutic drugs. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 75, p. 612-621, 1997.

MADSEN, J. L.; FUGLSANG, S. A. randomized, placebo controlled, crossover, double-blind trial of the NK1 receptor antagonist aprepitant on gastrointestinal motor function in healthy humans. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, p. 609-615, 2008.

MAGGI, C. A. Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. **Regulatory Peptides**, v. 93, p. 53-64, 2000.

MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P.; GIACHETTI, A. Tachykinin receptors and tachykinin antagonists. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 13, p. 23-93, 1993.

MALKESMAN, O.; BRAW, Y.; WELLER, A. Assessment of antidepressant and anxiolytic properties of NK1 antagonists and substance P in Wistar Kyoto rats. **Physiology & Behavior**, v. 90, p. 619-625, 2007.

MANTYH, P. W. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 63, p. 6-10, 2002.

MARQUEZ, M.; BOSCAN, P.; WEIR, H.; VOGEL, P.; TWEDT, D.C. Comparison of NK-1 receptor antagonist (maropitant) to morphine as a pre-anaesthetic agent for canine ovariohysterectomy. **PLoS ONE**, v. 10, p. 10, 2015.

McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2013p. 774-780.

MCMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Experimental Neurology**, v. 192, p. 444-462, 2005.

MEISENBERG, G.; SIMMONS, W. H. Behavioral alterations induced by substance P, bombesin, and related peptides in mice. **Peptides**, v. 7, p. 557-561, 1986.

MELLO, D. M. S.; MARCINICHEN, D. R.; MAGRUGA, D.; BRANCO, R.; PASCHOALINI, M. A.; LIMA, T. C. M. Involvement of NK1 receptors in metabolic stress markers after the central administration of substance P. **Behavioural Brain Research**, v. 181, p. 232-238, 2007.

MICHELSON, D.; HARGREAVES, R.; ALEXANDER, R; CEESAY, P.; HIETALA, J.; LINES, C. et al. Lack of efficacy of L-759274, a novel neurokinin 1 (substance P) receptor antagonist, for the treatment of generalized anxiety disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 1-11, 2013.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, p. 421-443, 2011.

MIKAWA, S.; YAMAMOTO, S.; ISLAM, M. S.; KAJI, N.; MURATA, T.; MIZUNO, R.; OZAKI, H.; HORI, M. Anti-emetic drug maropitant induces intestinal motility disorder but not anti-inflammatory action in mice. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, p. 1195-1199, 2015.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. São Paulo: Manole, 1999.

MITROVIC, B.; MARTIN, F. C.; CHARLES, A. C.; IGNARRO, L. J.; ANTON, P. A.; SHANAHAN, F.; MERRIL, J. E. Neurotransmitters and cytokines in CNS pathology. **Progress in Brain Research**, v. 103, p. 319-330, 1994.

MONIBI, F. A.; DODAM, J. R.; AXIAK-BECHTEL, S. M.; AMORIM, J.; ZHANG, Y.; TSURUTA, K.; MANN, F. A.; DE CLUE, A. E. Morphine and buprenorphine do not alter leucocyte production capacity, early apoptosis, or neutropil phagocytic function in healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 99, p. 70-76, 2015.

MONTEGOMERY, D. L. Astrocytes: form, functions and roles in disease. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 145-167, 1994.

MORIARTY, D.; GOLDHILL, J.; SELVE, N.; O'DONOOGHUE, D. P.; BAIRD, A. W. Human colonic anti-secretory activity of the potent NK1 antagonist, SR140333: assessment of potential anti-diarrhoeal activity in food allergy and inflammatory bowel disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 1346-1354, 2001.

MORRIS, R.; CHEUNSUANG, O.; STEWART, A.; MAXWELL, D. Spinal dorsal horn neuron targets for nociceptive primary afferents: do single neuron morphological characteristics suggest how nociceptive information is processed at the spinal level. **Brain Research Reviews**, v. 46, p. 173-190, 2004.

MUNOZ, M.; COVENAS, R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. **Amino Acids**, v. 46, p. 1727-1750, 2014.

NIEL J. P. Rôle de la substance P dans le contrôle nerveux de la motricité digestive. **Association des Physiologists.** Nancy, A65-A76, 1991.

OTSUKA, M.; YOSHIOKA, L. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiological Reviews**, v. 73, p. 229-308, 1993.

PALMA, C.; MAGGI, C. A. the role of tachykinins via receptors in progression of human gliomas. **Life Sciences**, v. 67 p. 985-1001, 2000.

PALMA, C.; MANZINI, S. Substance P induces secretion of immunomodulatory cytokines by human astrocytoma cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 81, p. 127-137, 1998.

PATTI, C. L.; FRUSSA-FILHO, R.; SILVA, R. H.; CARVALHO, R. C.; KAMEDA, S. R.; TAKATSU-COLEMAN, A. L.; CUNHA, J. L.; ABILIO, V. C. Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, p. 923-927, 2005.

PEKNY, M.; PEKNA, M.; MESSING, A.; STEINHAUSER, C.; LEE, J. M.; PARPURA, V. et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. **Acta Neuropathologica**, v. 131, p. 323-345, 2016.

PENNEFATHER, J. N.; LECCI, A.; CANDENAS, M. L.; PATAK, E.; PINTO, F. M.; MAGGI, C. A. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. **Life Sciences**, v. 74, p. 1445-1463, 2004.

QUAN, N.; HERKENHAM, M. Connecting cytokines and brain: a review of current issue. **Histology and Histopathology**, v. 17, p. 273-238, 2002.

RIVEST, S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, p. 13-19, 2003.

RUPNIAK, N. M.; KRAMER, M. S. Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 485-490, 1999.

SANDFORD, J. J.; ARGYROPOULOS, S. V.; NUTT, D. J. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: basic neurobiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, p. 197-212, 2000.

SANTARELLI, L.; GOBBI, G.; DEBS, P.C.; SIBILLE, E.T.; BLIER, P.; HEN, R.; HEATH, M.J. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.1912-1917, 2001.

SHAIK, M. B.; SIEGEL, A. Neuroanatomical and neurochemical mechanisms underlying amygdaloid control of defense rage behavior in the cat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 2759-2779, 1994.

SHIBATA, M.; HORI, T.; KIYOHARA, T.; NAKASHIMA, T.; ASAMI, T. Responses of anterior hypothalamic-preoptic thermosensitive neurons to substance P and capsaicin. **Neuropharmacology**, v. 27, p. 143-148, 1988.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, p. 7-35, 2010.

SONG, P.; ZHAO, Z. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. **Neuroscience Research**, v. 39, p. 281-286, 2001.

SOSULINA, L.; STRIPPEL, C.; ROMO-PARRA, H. et al. Substance P excites GABAergic neurons in the mouse central amygdala through neurokinin 1 receptor activation. **Journal of Neurophysiology**, v. 114, p. 2500-2508, 2015.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Philosophical Ver**, v. 72, p. 825-839, 1992.

STANISZ, A. M. Neurogenic inflammation: Role of substance. **NeuroImmune Biology**, v. 1, p. 373-378, 2001.

SUN, G. Y.; HU, Z. Y. Stimulation of phospholipase A2 expression in rat cultured astrocytes by LPS, TNF alpha and IL-1 beta. **Progress in Brain Research**, v. 105, p. 231-238, 1995.

SWIERGIEL, A. H.; DUNN, A. J. Effects of Interleukin-1 β and Lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 86, p. 651-659, 2007.

TAKESHITA, Y.; RANSOHOFF, R. M. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain-barrier: chemokine regulation in vitro models. **Immunological Reviews**, v. 248, p. 228-239, 2012.

TARASSISHIN, L.; SUH, H.-S.; LEE, S. C. LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14. **Glia**, v. 62, p. 999-1013, 2014.

THORNTON, E.; VINK, R. Substance P and its tachykinin NK1 receptor: a novel neuroprotective target for Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 10, p. 1403-1405, 2015.

TORIHASHI, S.; OZAKI, H.; HORI, M.; KITA, M.; OHOTA, S.; KARAKI, H. Resident macrophages activated by lipopolysaccharide suppress muscle tension and initiate inflammatory response in the gastrointestinal muscle layer. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 113, p. 73-80, 2000.

TOUGH, I. R.; LEWIS, C. A.; FOZARD, J.; COX, H. M. Dual and selective antagonism of neurokinin NK1 and NK2 receptor-mediated responses in human colon mucosa. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 367, p. 104-108, 2003.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 9, p. 203-222, 1985.

VAN RENSEN, E. L.; HIEMSTRA, P. S.; RABE, K. F.; STERK, P. J. Assessment of microvascular leakage via sputum induction: the role of substance P and neurokinin A in patients with asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, p. 1275-1279, 2002.

VAN WIMERSMA GREIDANUS, T. B.; MAIGRET, C. Grooming behavior induced by substance P. **European Journal of Pharmacology**, v. 154, p. 217-220, 1988.

VENDRUSCOLO, L. F.; TAKAHASHI, R. N.; BRÜSKE, G. R.; RAMOS, A. Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. **Psychopharmacology**, v. 170, p. 287-293, 2003.

VILISAAR, J.; ARSENESCU, R. I. Roles of substance P in gastrointestinal functions and neuroimmune interactions. In: CONSTANTINESCU, C.; ARSENESCU, R.; ARSENESCU, V. (eds) **Neuro-Immuno-Gastroenterology**, Springer, 2016, p.53-73.

WOMACK, M. D.; BARRETT-JOLLEY, R. Activation of paraventricular nucleus neurones by the dorsomedial hypothalamus via a tachykinin pathway in rats. **Experimental Physiology**, v. 92, p. 671-676, 2007.

WOMACK, M. D.; MORRIS, R.; GENT, T. C.; BARRETT-JOLLEY, R. Substance P targets sympathetic control neurons in the paraventricular nucleus. **Circulation Research**, v. 100, p. 1650-1658, 2007.

YU, J., CADET, J. L.; ANGULO, J. A. Neurokinin-1 (NK-1) receptor antagonists abrogate methamphetamine-induced striatal dopaminergic neurotoxicity in the murine brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, p. 613-622, 2002.

C E R T I F I C A D O

"Certificamos que a proposta intitulada “..EFEITO ANTI-FLAMATÓRIO E ANSIOLÍTICO DO MAROPITANT EM RATOS SUBMETIDOS AO LPS..”, registrada com o nº 042/16, sob a responsabilidade de FERNANDO BONDAN e PIETRO DOMINGUES DOSSA - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº [11.794](#), de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº [6.899](#), de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) UNIP em reunião de 17/08/2016

Finalidade	Ensino ()	Pesquisa Científica (X)
Vigência de autorização		01/04/2016 À 001/12/2017
Espécie / linhagem/ raça		RATO HETEROGÊNICO WISTAR
Nº de animais		40
Peso / idade		90 DIAS/ 250 G
Sexo		FÉMEA
Origem		BIOTÉRIO USP



Juliana Guizi

Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Universidade Paulista – UNIP