



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-graduação em Patologia Humana**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EFEITO ANTIDIPSOGÊNICO E ANTINATRIOREXIGÊNICO  
DA IL-1 $\beta$  INJETADA NO NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIANO  
E NO ÓRGÃO SUBFORNICAL**

**Diana Rodrigues de Cerqueira**

**Salvador- Bahia- Brasil  
2012**



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ-FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**EFEITO ANTIDIPSOGÊNICO E ANTINATRIOREXIGÊNICO  
DA IL-1 $\beta$  INJETADA NO NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIANO E  
NO ÓRGÃO SUBFORNICAL**

Diana Rodrigues de Cerqueira

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Josmara Bartolomei Fregoneze

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

Salvador- Bahia-Brasil  
2012

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C411 Cerqueira, Diana Rodrigues de  
Efeito antidipsogênico e antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$  Injetada no núcleo pré-  
óptico e no órgão subfornical [manuscrito] / Diana Rodrigues de Cerqueira.-  
2012.

74 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa  
Gonçalo Moniz. 2012.

Orientador <sup>a</sup>: Dr <sup>a</sup>. Josmara Bartolomei Fregoneze, Laboratório de  
Neurociência /ICS/UFBA.

1. Interleucina 1 $\beta$  2. Núcleo pré-óptico mediano. 3. Órgão subfornical. 4.  
Apetite por sódio I. Título

CDU 577.21:575.113

A realização deste trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia– FAPESB e do Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq.

*“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”.*

*Paulo Freire*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Pai celeste, mentor da minha vida.

Aos meus verdadeiros amores e incentivadores: Márcia, Tino, Diogo e Vó Ricarda.

Ao Professor Emílio Silva (*in memoriam*) pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À professora Josmara Fregoneze, pela orientação e dedicação ao Laboratório de Neurociências.

Aos professores que auxiliaram e auxiliam na minha formação estudantil e humana.

Aos animais, o meu carinho e respeito.

Às professoras Rejane Santana, Hilda Ferreira e Carla Patrícia pela preciosa disponibilidade de atender as nossas dúvidas e auxiliar na formação de aspirantes a pesquisadores.

Ao meu fiel amigo José de Souza.

À Ana Isabel, fiel companheira de bancada e estudo, e muito mais...

A todos os alunos de iniciação científica, em especial Camila e Andrei.

À Átila, Daniela e Lília, pela alegria da convivência.

Aos queridos Jenilson e Paulo Lucas.

À turma de mestrandos de 2010.1

Muito obrigada!

# SUMÁRIO

	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	9
	<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b>	11
I	<b>RESUMO</b>	12
II	<b>ABSTRACT</b>	13
III	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
IV	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	16
IV. 1-	Homeostasia do Sódio	16
IV. 2-	Apetite por Sódio e Sua Regulação	17
IV. 3-	Protocolos Experimentais para Indução do Apetite por Sódio	23
IV. 4-	Interleucina-1: características biológicas	24
IV. 5-	Interleucina -1 $\beta$ e o Sistema Nervoso Central	26
IV. 6-	Interleucina-1 $\beta$ e Ingestão de alimentos e água	28
V.	<b>OBJETIVO E HIPÓTESES</b>	30
VI.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	31
VI. 1.	Animais	31
VI. 2.	Cirurgia estereotáxica	31
VI. 3.	Drogas e microinjeções	32
VI. 4.	Histologia	32
VI. 5-	<b>PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS</b>	33
VI. 5.1-	Depleção de sódio	33
VI. 5.2-	Teste de sobremesa	33
VI. 5.3-	Teste do campo Aberto	34
VI. 5.4-	Registro da temperatura corporal	35

VI. 5.5-	<b>DESENHOS EXPERIMENTAIS</b>	35
VI. 5.6-	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	37
VII.	<b>RESULTADOS</b>	38
VIII.	<b>DISCUSSÃO</b>	54
X	<b>REFERÊNCIAS</b>	62



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADH	Hormônio anti-diurético
AII	Angiotensina II
ALDO	Aldosterona
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol -propiónico
AP	Área postrema
AT <sub>1</sub>	Receptores para angiotensina do tipo 1
A3V3	Região anteroventral do terceiro ventrículo
BST	Leito da estria terminal
CCK	Colecistocinina
CCKA	Antagonista do receptor CCK tipo A
CeA	Amígdala central
CRH	Hormônio liberador da corticotrofina
CVOs	Órgãos circunventriculares
DMH	Hipotalâmico dorsomedial
DOCA	Acetato de deoxicorticosterona
ECA	Enzima conversora da Angiotensina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
H2D2	Neurônios sensíveis a aldosterona
HA	Área hipotalâmica
HLA	Área hipotalâmica lateral
i.c.v	Intracerebroventricular
IL-10	Interleucina-10
IL-1R	Receptor interleucina-1
IL -1-RAcP	Proteína acessória do receptor IL-1
IL-1RA	Antagonista do receptor IL-1
IL-1 $\alpha$	Interleucina-1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
LEC	Compartimento líquido extracelular
LIC	Compartimento líquido intracelular
LPBN	Núcleo parabraquial lateral
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MeA	Amígdala medial
m-CPBG	m-chlorofenilbiguanida
MnPO	Núcleo pré-óptico mediano
NAc	Núcleo accumbens
NA <sub>x</sub>	Canais sensíveis a variações do sódio
NF $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kapa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nor-BNI	Nor-binaltorfimina
NTS	Núcleo do trato solitário

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADH	Hormônio anti-diurético
AII	Angiotensina II
ALDO	Aldosterona
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol -propiónico
AP	Área postrema
AT <sub>1</sub>	Receptores para angiotensina do tipo 1
A3V3	Região anteroventral do terceiro ventrículo
BST	Leito da estria terminal
CCK	Colecistocinina
CCKA	Antagonista do receptor CCK tipo A
CeA	Amígdala central
CRH	Hormônio liberador da corticotrofina
CVOs	Órgãos circunventriculares
DMH	Hipotalâmico dorsomedial
DOCA	Acetato de deoxicorticosterona
ECA	Enzima conversora da Angiotensina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
H2D2	Neurônios sensíveis a aldosterona
HA	Área hipotalâmica
HLA	Área hipotalâmica lateral
i.c.v	Intracerebroventricular
IL-10	Interleucina-10
IL-1R	Receptor interleucina-1
IL -1-RAcP	Proteína acessória do receptor IL-1
IL-1RA	Antagonista do receptor IL-1
IL-1 $\alpha$	Interleucina-1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
LEC	Compartimento líquido extracelular
LIC	Compartimento líquido intracelular
LPBN	Núcleo parabraquial lateral
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MeA	Amígdala medial
m-CPBG	m-chlorofenilbiguanida
MnPO	Núcleo pré-óptico mediano
NAc	Núcleo accumbens
NA <sub>x</sub>	Canais sensíveis a variações do sódio

NFκB	Fator de transcrição nuclear kapa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nor-BNI	Nor-binaltorfimina
NTS	Núcleo do trato solitário
OVL	Órgão vasculoso da lâmina terminal
PVN	Núcleo hipotalâmico paraventricular
PEG	Polietilenoglicol
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
5-HT	Serotonina
5-HT <sub>1</sub>	Receptor serotoninérgico do tipo 1
SNC	Sistema Nervoso Central
SON	Núcleo supra-óptico
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
VMH	Hipotálamo ventromedial

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Fotomicrografia típica (A) e diagrama (Watson & Paxinos, 1998) (B) de corte de cérebro de rato mostrando local da microinjeção no MnPO	38
Figura 2	Fotomicrografia típica (A) e diagrama (Watson & Paxinos, 1998) (B) de corte de cérebro de rato mostrando local da microinjeção no SFO	39
Figura 3	Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ no MnPO sobre a ingestão de salina 1,5% em animais depletados de sódio.	41
Tabela 1	Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ no MnPO sobre a ingestão de água destilada e de salina 1,5% em animais depletados de sódio.	42
Figura 4	Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ no SFO sobre a ingestão de salina 1,5% em animais depletados de sódio.	44
Tabela 2	Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ no SFO sobre a ingestão de água destilada e de salina 1,5% em animais depletados de sódio.	45
Figura 5	Comparação do efeito antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$ injetada no SFO e no MnPO.	46
Figura 6	Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ no MnPO sobre a temperatura corporal de ratos depletados de sódio.	47
Figura 7	Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ no SFO sobre a temperatura corporal de ratos depletados de sódio.	48
Figura 8	Comparação do efeito hipertermico da IL1 $\beta$ injetada no SFO e no MnPO.	49
Figura 9	Teste de sobremesa em animais privados de água por 24 horas que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$ ou salina 0,9% no MnPO.	50
Figura 10	Teste de sobremesa em animais privados de água por 24 horas que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$ ou salina 0,9% no SFO.	51
Figura 11	Teste do campo aberto em animais depletados de sódio que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$ ou salina 0,9% no MnPO.	52
Figura 12	Teste do campo aberto em animais depletados de sódio que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$ ou salina 0,9% no SFO.	53

## I. RESUMO

Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) pode modular funções homeostáticas controladas pelo sistema nervoso central, incluindo a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, termorregulação, pressão arterial e comportamento ingestivo. Estudos anteriores do Laboratório de Neurociências mostram que IL-1 $\beta$  injetada no terceiro ventrículo cerebral inibe a ingestão de água em animais submetidos a diferentes protocolos e inibe o apetite por sódio em animais depletados deste íon. O núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e o órgão subfornical (SFO) são áreas importantes no controle da homeostasia hidrossalina. Assim, a proposta deste estudo foi investigar o efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  no MnPO ou SFO sobre a ingestão de sal em animais depletados de sódio. Ratos Wistar (250-270g) foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/7mg/kg) para cirurgia estereotáxica de implante de cânula guia no MnPO ou SFO. Quatro dias após a cirurgia os animais foram submetidos à depleção de sódio por injeções de furosemida (20 mg/kg, s.c) e mantidos com livre acesso a água destilada e dieta hipossódica. 24 horas após os animais receberam microinjeções de IL-1 $\beta$ , nas doses 1,6, 0,8 e 0,4 ng/rato. A ingestão de sal foi monitorada por 120 minutos e ao final das sessões experimentais, os animais foram anestesiados, submetidos à perfusão transcardíaca com salina 0,9% seguido de formol 10% e os encéfalos removidos para processamento histológico. Apenas os dados dos animais cuja cânula estava no MnPO ou SFO foram analisados. IL-1 $\beta$  injetada no MnPO e no SFO inibe o apetite por sódio, em animais depletados deste íon, sendo o MnPO mais sensível a ação da IL-1 $\beta$  que o SFO. A ação da IL-1 $\beta$  no MnPO e no SFO no apetite por sódio foi específica e não associada a uma deficiência locomotora ou mal estar generalizado que impossibilitasse o animal a buscar da solução sacarina, uma vez que tanto a locomoção quanto a ingestão de sacarina 0,1% dos animais não foi alterada pela IL-1 $\beta$ . Observou-se também aumento da temperatura corporal após tratamento com IL-1 $\beta$ , sendo a hipertermia mais expressiva após injeção no MnPO do que no SFO. Os resultados obtidos com este trabalho indicam que o MnPO é mais sensível a ação da IL-1 $\beta$  que o SFO e sugerem papel modulatório da IL-1 $\beta$  sobre a homeostasia hidrossalinana, mais especificamente, no apetite por sódio.

Palavras-chave: Interleucina-1 $\beta$ , núcleo pré-óptico mediano, órgão subfornical, apetite por sódio.

## II. ABSTRACT

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) may acts on the central nervous system integrating and modulating homeostatic functions including the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, control of blood pressure and body temperature and ingestive behavior. Previous data from our laboratory showed that intracerebroventricular injection of IL-1 $\beta$  inhibits sodium appetite. However, the action of IL-1 $\beta$  in specific brain areas controlling this behavior is unknown. It is well documented that MnPO and SFO is an important brain sites involved in the control of water and salt intake. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of IL-1 $\beta$  microinjections into MnPO or SFO on salt intake in sodium-depleted rats. Wistar male rats (240-270g) were implanted with guide cannula in the MnPO or SFO under anesthesia with ketamine/xylazine (80/7 mg/kg i.p). The animals were submitted to sodium depletion by injection of furosemide (20 mg/kg, sc) and maintained with free access to distilled water and low sodium diet. Salt intake was monitored for 120 minutes after microinjection and at the end of the experiments the animals were anesthetized, submitted to a transcardiac perfusions with saline followed by 10% formalin and have their brain removed for histological procedure. Only data from animals whose guide cannulas were in the MnPO or SFO were considered. The results show that microinjection of IL-1 $\beta$  into MnPO and SFO inhibits the hypertonic saline intake throughout the experimental session. The inhibitory effect of IL-1 $\beta$  in MnPO on salt intake was more intense than SFO. Furthermore, the inhibition of sodium appetite seems not to be due to inhibition of locomotor activity or to any change in palatability, since microinjections of IL-1 $\beta$  in MnPO or SFO failed to modify the intake of a 0.1% saccharin solution when the animals were submitted to a "dessert test" or to induce any significant locomotor deficit in the open-field test. It was also observed a rise in body temperature after treatment with IL-1 $\beta$  and this hyperthermia was more significant after injection into MnPO than SFO. The results of this study indicate that the MnPO is more sensitive to IL-1 $\beta$  in MnPO than SFO and suggest modulatory role of IL-1 $\beta$  in this site on hydrosaline homeostasis especially in sodium appetite.

Key words: Interleukin-1 $\beta$ , sodium appetite, preoptic median nucleus, subfornical organ.

### III. INTRODUÇÃO

Alterações na homeostasia dos líquidos corporais são transmitidas momento a momento ao sistema nervoso central. A regulação primária dos compartimentos líquidos corporais dá-se pela ingestão e excreção de água e eletrólitos pelos rins, assim, ajustes são necessários quando há desequilíbrio entre estas variáveis. O cérebro integra os sinais sensoriais e hormonais da periferia e dirige correções através de mudanças autonômicas, endócrinas e comportamentais. A sede e o apetite por sódio são comportamentos essenciais para correção da homeostasia hidrossalina (Antunes-Rodrigues et al, 2004; McKinley & Johnson, 2004). O apetite por sódio é um estado comportamental motivado, relacionado à perda orgânica deste íon e tem como características ingestão seletiva deste íon e a aceitação de soluções hipertônicas.

O apetite por sódio e a sede são comportamentos modulados por neurotransmissores e/ou neuromoduladores no SNC através de receptores localizados nas áreas envolvidas na regulação destes comportamentos. Dentre as áreas centrais envolvidas, os órgãos circumventriculares, como o órgão subfornical e o órgão vascular da lâmina terminal, tem valiosa participação na regulação central destes comportamentos, estas áreas apresentam receptores para angiotensina II e renina e, por estarem fora da barreira hematoencefálica, alterações na osmolairidade/ natremia são percebidas por estas áreas (McKinley & Johnson, 2004).

Poucos estudos mostram a participação de citocinas na regulação da homeostasia hidrossalina. A interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) pode atuar sobre o sistema nervoso central integrando e modulando funções homeostáticas incluindo a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, mudanças na temperatura corporal e pressão arterial, e comportamento ingestivo (Gadek-Michalska et al, 2011; Káradí et al, 2005; Takács et al, 2010) assim, a investigação do papel da IL-1 $\beta$  sobre a regulação da homeostasia dos compartimentos líquidos corporais é importante, visto que tanto animais quanto humanos quando acometidos por infecções, doenças autoimunes e alguns tipos de câncer liberam esta citocina naturalmente. (Dinarello, 1996; Goto et al, 1990; Lewis et al, 2006).

A comunicação entre os sistemas endócrino, imunológico e nervoso central tem sido investigada e as alterações metabólicas, viscerais e comportamentais promovidas por

mediadores moleculares comuns a estes sistemas são conhecidas. O SNC e o sistema imunológico são os maiores sistemas adaptativos e respondem de maneira rápida a alterações que comprometem o bem estar do indivíduo. Existem evidências da participação da IL-1 $\beta$ , central e periférica, nas alterações comportamentais e viscerais durante a resposta à infecção (Allan et al, 2005; Sherry et al, 2010). A ingestão de água e o apetite por sódio constituem mecanismos comportamentais envolvidos no controle da homeostasia hidrossalina, sendo regulados por diversas áreas centrais e vias neurotransmissoras. Injeção central de IL-1 $\beta$  inibe a ingestão de água (Kerádi et al, 2005; De Castro e Silva et al, 2006, Luz et al, 2009; Takács et al, 2010), contudo, os estudos investigando o papel da IL-1 $\beta$  sobre a regulação do apetite por sódio são escassos (Osaka et al, 1992, De Castro e Silva, 2006). O MnPO e o SFO são áreas centrais envolvidas no controle da homeostasia hidrossalina, altamente sensíveis a variações na osmolaridade e a angiotensina periférica (Johnson & Loewy, 1993). Trabalhos desenvolvidos no laboratório de Neurociências forneceram elucidações valiosas sobre o envolvimento da IL-1 $\beta$  sobre o controle da sede (De Castro e Silva et al, 2006; Luz et al, 2009), entretanto, foram utilizadas injeções no terceiro ventrículo, o que não permite identificar quais áreas centrais estariam envolvidas nesta resposta.

Diante do envolvimento da IL-1 $\beta$  em diversas manifestações viscerais e comportamentais comuns em indivíduos doentes, sua associação a manifestações clínicas de alta prevalência como “sickness behavior”, depressão e doenças autoimunes (Dantzer et al, 2008, Kelley et al, 2003) e a escassez de estudos mostrando o envolvimento de IL-1 $\beta$  na regulação de comportamentos regulados pelo SNC como homeostasia hidrossalina, a investigação dos mecanismos de ação desta citocina em áreas centrais como o MnPO e o SFO, que estão relacionadas a regulação do apetite por sódio, são de fundamental importância, sendo este o principal objetivo deste estudo.



## IV. REVISÃO DA LITERATURA

### IV.1- Homeostasia do Sódio

O sódio é um dos principais e mais importantes constituintes do líquido do extracelular. Este íon é considerado um soluto efetivo, pois sua permanência no compartimento extracelular promove gradiente de pressão osmótica através das membranas celulares conduzindo a água do compartimento intracelular para o extracelular, conseqüentemente, este íon é determinante para a separação dos compartimentos. (Verbalis, 2003; Daniels & Fluharty, 2004; McKinley & Johnson, 2004).

O sódio é de fundamental importância para a manutenção da vida. Este íon, dentre outros, é determinante da osmolalidade plasmática e do volume do compartimento extracelular (Verbalis, 2003; Bianchetti et al, 2009; Peruzzo, et al, 2010). Por circundar as células, o sódio na matriz líquida deve ser estritamente regulado para assegurar o funcionamento ótimo de inúmeros processos fisiológicos, aos quais estão incluídos: condutância dos íons através das membranas celulares, excitabilidade neural, equilíbrio ácido-básico, estabilidade da pressão sanguínea e da função cardíaca normal (Geerling & Loewy, 2008; Mohan & Campbell, 2009). A queda dos níveis de sódio tem como principais conseqüências a diminuição do peso dos ossos e dos músculos, diminuição da síntese protéica e da expressão de RNA mensageiro (RNAm), alterações no metabolismo da glicose e modificações na viscosidade sanguínea (Morris et al, 2008), assim sendo, desordens na homeostase do sódio trazem sérias conseqüências.

Todos os vertebrados mantêm a homeostasia hidrossalina primariamente pela regulação da ingestão e excreção urinária de água e eletrólitos. Quando a água e o sódio em quantidades fisiologicamente significantes são perdidos, há a necessidade da realização de ajustes, a fim de manter estas variáveis dentro das condições ótimas de equilíbrio homeostático (Antunes-Rodrigues et al; 2004; Krause & Sakai, 2007). Diversas condições fisiológicas e patológicas geram desidratação dos compartimentos líquido intracelular (LIC) e extracelular (LEC). Quando ocorre perda de água tem-se essencialmente uma desidratação do LIC, embora a perda de líquido hipotônico promova hipovolemia nos dois compartimentos (Johnson, 2007). A expansão do volume do LEC está condicionada a ingestão de sódio, a ingestão de água é adequada para o reestabelecer o volume do LEC em condições de hipernatremia. A perda inicial do líquido hipotônico resulta em hipernatremia, uma vez que

promove desidratação no LIC. Perda de líquido hipertônico, no LEC, não é corrigida apenas com a ingestão de água (Johnson, 2007; Geerling & Loewy, 2008). Desvios na homeostasia dos líquidos corporais ativam sinais sensoriais e hormonais que por via neuronal conduz as informações ao cérebro, alterações na homeostasia hidrossalina são corrigidas através de mudanças autonômicas, endócrinas e comportamentais. Os mecanismos comportamentais participam da ingestão de água e cloreto de sódio e mediadores autonômicos e hormonais estabilizam a taxa de perda destas substâncias pelos rins (Johnson & Thunhorst, 1997; Morris et al, 2008). O equilíbrio dos líquidos corporais é essencial para a preservação da vida.

## **IV.2 - Apetite por Sódio e Sua Regulação**

O apetite por sódio é um estado comportamental motivado e altamente conservado, comum a muitas espécies de animais e relacionado a perda orgânica deste íon (Fitzsimons, 1998). A ingestão de sal por animais que nunca tiveram contato com solução salina é evidência de que o comportamento ingestivo associado ao apetite por sal é inato, o animal quando tem acesso ao sódio rapidamente o ingere, embora este comportamento seja passível de modificação como resultado de experiências anteriores. (Stellar, 1993; Daniels & Fluharty, 2004; Krause & Sakai, 2007). O apetite por sódio tem como característica ingestão seletiva deste íon e a aceitação de soluções hipertônicas. O apetite por sódio não é desencadeado apenas por hiponatremia, para induzir apetite por sódio é necessário que a diminuição na concentração de sódio do compartimento líquido extracelular seja acompanhada por redução do seu volume (De Luca Jr et al, 2010; Geerling & Loewy, 2008). O estado dos compartimentos líquidos corporais é informado ao SNC através de variações nos níveis de hormônios como a aldosterona (ALDO) e angiotensina II (AII), variações na concentração de sódio plasmático e variações na pressão sanguínea. As alterações do LEC são inicialmente detectadas pelos receptores para sódio e/ou osmorreceptores localizados na cavidade orofaríngea, no trato gastrointestinal, no fígado, nas proximidades do espaço porta e rins (Antunes-Rodrigues, 2004; Bourque, 2008), barorreceptores carotídeos e atriais que detectam mudanças no volume sanguíneo, e os quimiorreceptores localizados na língua, fornecem os estímulos aferentes excitatórios ao SNC (Antunes-Rodrigues, 2004; Daniels & Fluharty, 2004). No SNC ocorre a integração das respostas regulatórias.

O sistema gustatório parece ter um papel crítico na mediação da ingestão de sal. O apetite por sódio é o único, dentre os comportamentos ingestivos, que apresenta canais sensoriais capazes de definir com precisão o sódio (Daniels & Fluharty, 2004). A informação do sabor salgado é percebida primeiramente pelos canais epiteliais seletivos ao sódio (ENaC) e tem origem na língua e orofaringe onde é percebida pelos nervos facial (VII), glossofaríngeo (IX) e vago (X) (Boughter Jr & Bachmanov, 2007). Estudos indicam que a corda timpânica, um ramo do nervo VII que inerva 2/3 da língua, região que contém grande número de fibras sensíveis ao sódio, seja a principal rota para a informação do sabor salgado ao SNC (Boughter Jr & Bachmanov, 2007; Geerling & Loewy, 2008). As informações viscerais e as sensações gustatórias alcançam o cérebro através destes pares de nervos, que se projetam diretamente para o núcleo do trato solitário (NTS) e desta área para núcleo parabraquial (PBN), do PBN vários axônios partem para estruturas prosencefálicas que participam dos mecanismos regulatórios do apetite por sódio (Daniels & Fluharty, 2004; Krause & Sakai, 2007).

O apetite por sódio e a sede são comportamentos necessários para reestabelecimento do LIC e LEC frente a desequilíbrios na homeostasia hidrossalina, são modulados por alguns neurotransmissores e/ou neuromoduladores no SNC através de receptores localizados nas áreas envolvidas na regulação destes comportamentos. Diversos estudos mostram o envolvimento das vias de neurotransmissão central angiotensinérgica, serotoninérgica, GABAérgica, histaminérgica, colinérgica e adrenérgica no controle da homeostasia hidrossalina (Saad et al 2006; Luz et al, 2006, Luz et al 2007; Henry & Mougnot, 2009; Magrani et al, 2005; Kolaj et al, 2004), entretanto poucos trabalhos mostram a participação de citocinas, dentre elas a interleucina - 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).

Dentre as principais áreas centrais envolvidas, a lâmina terminal apresenta estruturas sensoriais que detectam alterações químicas no líquido cefalorraquidiano próximo aos ventrículos. Os órgãos circunventriculares (CVOs) são caracterizados por apresentarem barreira hematoencefálica diferenciada, isto se deve aos capilares fenestrados, que permitem a passagem de substâncias de elevado peso molecular do plasma para o parênquima cerebral (Engelhardt, 2003) além de apresentarem receptores para renina e angiotensina. Os CVOs incluem: área postrema (AP), o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e o órgão subfornical (SFO). O núcleo pré-óptico mediano (MnPO) é uma estrutura importante na regulação central do apetite por sódio e da pressão arterial, não integra os CVOs mas está

localizado entre o OVLT e SFO compondo a lâmina terminal (Fitzsimons, 1998; Mckinley et al, 2003). Estudos mostram que canais sensíveis a variações do sódio ( $\text{Na}_x$ ) estão presentes nos CVOs e que após depleção de sódio, animais “knockout” para estes canais ingerem salina hipertônica em excesso (Watanabe et al, 2000; Noda et al 2006), enquanto animais selvagens que receberam injeções intracerebroventricular(i.c.v) de salina hipertônica apresentam robusta ingestão de água e animais “knockout” para  $\text{Na}_x$  não apresentaram este comportamento (Hiyama et al, 2004). Animais hiponatremicos que receberamrenina i.c.v apresentam robusta ingestão de salina hipertônica e elevada expressão de c-Fos nos órgãos circumventriculares (Passos Jr et al, 2007).Aninais normonatremicos que receberam renina i.c.v apresentam aumento significativo na ingestão de água, na pressão arterial e elevada expressão de c-Fos e Erg-1, marcadores da atividade neuronal, nos órgãos circumventriculares (Xu & Johnson, 1998).

A área postrema (AP), localizada sobre a superfície dorsal do bulbo e região caudal do quarto ventrículo, recebe seu suplemento sanguíneo das artérias cerebral inferior e posterior; este arranjo vascular pode servir como uma ligação funcional entre a AP e o NTS fornecendo uma possível rota de comunicação química (Johnson & Loewy, 1993; Miller & Leslie, 1994). A AP recebe estímulos aferentes do nervo vago e dos núcleos hipotalâmicos paraventricular (PVN) e dorsomedial (DMH) (Fitzsimons, 1998) e seus neurônios se projetam para o núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo parabraquial lateral (LPBN) (McKinley & Johnson, 2004; Stricker & Hoffmann, 2006). Esta área circumventricular parece estar envolvida em várias funções homeostáticas como o controle da ingestão de água e alimentos e função cardiovascular (Fitzsimons, 1998) e na percepção química de toxinas eméticas no sangue (Miller & Leslie; 1994). Estudos com ratos mostram que lesões na AP promovem espontâneo aumento da ingestão de sal, contudo sua remoção não é crítica para vida (Fitzsimons, 1998; Johnson, 2007; Johnson & Loewy, 1993).

O órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) se estende através da parede dorsal e ventral do terceiro ventrículo (3V), é altamente vascularizado e como o SFO, banhado pelo conteúdo do 3V. Por métodos bioquímicos e imunohistoquímicos diversos neuropeptídios, neurotransmissores e seus receptores foram detectados no OVLT, como exemplo a dopamina, a noradrenalina, a serotonina, a acetilcolina a oxitocina, a AII e o hormônio anti-diurético (ADH) (Johnson & Loewy, 1993 Mckinley et al 1999). O OVLT integra o circuito primário para a detecção de aumento na osmolaridade nos compartimentos líquidos corporais (Dijk et

al, 2011). Células nesta região são sensíveis a AII e são ativadas, por exemplo, durante a hipovolemia, quando ocorre o aumento nas concentrações deste peptídeo (Mckinley et al 1992; Weisinger et al, 1996; Antunes-Rodrigues, 2004). A ativação desta área por AII circulante pode induzir sede, secreção do ADH e apetite por sódio (Fitzsimons, 1998; Johnson & Thunhorst, 1997; Mckinley et al, 2003). No OVLT, células gliais e neurônios expressam canal de sódio  $Na_x$  sensíveis a aumentos na concentração deste íon no LEC que ocorre após privação hídrica prolongada ou após ingestão de salina hipertônica (Watanabe et al, 2000; 2006; Noda et al, 2006). Lesão no OVLT promove diminuição significativa no apetite por sódio em animais hiponatrêmicos e diminuição da sede em animais privados de água (Johnson & Gross, 1993). O OVLT faz conexões com o SFO, o MnPO, o núcleo supra-óptico (SON), PVN, leito da estria terminal (BST), área hipotalâmica lateral (HLA), dentre outras áreas (McKinley et al, 2004). Por apresentar as características anatômicas e moleculares citadas esta área é importante na detecção primária de variações na osmolaridade/natremia dos compartimentos líquidos corporais e regulação da sede e do apetite por sódio.

O órgão subfornical (SFO) está localizado ao teto do 3V e, como os outros CVOs, apresenta sensibilidade a AII e ALDO periférica e intensas conexões com outras áreas envolvidas na regulação central da homeostasia hidrossalina como o MnPO e OVLT (Johnson & Loewy, 1993). Células gliais do SFO, como de outras áreas da lâmina terminal, apresentam o canal seletivo de sódio  $Na_x$ , sensível a aumentos na concentração extracelular deste íon (Watanabe et al, 2000; Grob et al, 2004). Tanto animais submetidos a privação hídrica quanto animais que receberam i.c.v salina de hipertônica apresentam ativação dos canais de sódio  $Na_x$  (Watanabe et al, 2000), técnicas de biologia molecular identificaram o SFO como importante área no controle da ingestão de sódio, onde os canais  $Na_x$  estão envolvidos na percepção do aumento das concentrações plasmáticas deste íon (Hiyama et al, 2004). Lesão no SFO ou injeção com losartan, antagonista dos receptores  $AT_1$ , promove redução da ingestão de água em animais hipovolêmicos, (Fitzsimons, 1998; McKinley et al, 1999), estudos mostram que a AII circulante ao se ligar aos  $AT_1$  induz a ingestão de água (Fitzsimons, 1998; McKinley et al, 1999). Injeção de AII no ventrículo lateral, em animais tratados com polietilenoglicol (PEG) promove aumento na ingestão de água e expressão de c-Fos no SFO, MnPO e PVN e o pré-tratamento com injeções periféricas de losartan, inibe a ingestão de água e a expressão de c-Fos nestas áreas, sendo a inibição da expressão de c-Fos no SFO mais significativa (Crews & Rowland, 2005). Em animais depletados de sódio a

injeção periférica de losartan inibe o apetite por sódio e a expressão de c-Fos no MnPO e SFO, sendo a inibição mais significativa no SFO (Crews & Rowland, 2005). O SFO, OVLT e o MnPO integram a lâmina terminal, estas áreas apresentam conexões recíprocas sendo estruturas importantes no circuito primário de detecção de desvios da homeostase hidrossalina.

O núcleo pré-óptico mediano (MnPO), localizado ao longo da parede rostral do 3V, entre o OVLT e o SFO (McKinley & Johnson, 2004), apresenta conexões com áreas que integram a rede de controle central do equilíbrio hidrossalino e função cardiovascular como o PVN, SON, LPB, HLA (Johnson & Loewy, 1993). A região ventral do MnPO junto com o OVLT integram a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) (Johnson & Thunhorst, 1997), sinalizações de neurônios do SFO e do OVLT e os sinais sensoriais de estruturas romboencefálicas parecem que são integrados no MnPO (McKinley & Johnson, 2004). Animais que receberam microinjeção no MnPO de ácido ibotênico, neurotoxina que danifica os corpos celulares, mas preserva as fibras neuronais de passagem, e são submetidos a depleção de sódio por injeções com furosemida apresentam redução da ingestão salina hipertônica (Lucca Jr & Francis, 2004). Lesões combinadas no OVLT e SFO, mas com o MnPO intacto, induz diminuição na ingestão de líquidos, mas preservam o comportamento, sugerindo a participação de outras estruturas centrais no comportamento (McKinley, 1999).

Estudos com técnicas de eletrofisiologia confirmam a presença de população neuronal sensível a flutuações da natremia através dos canais de sódio  $Na_x$  presentes nestas células (Watanabe et al, 2000, Grob et al, 2004). Animais Dahl S, sensíveis ao sódio, submetidos à dieta rica deste íon, apresentam aumento na expressão da proteína Fra-LI, marcadora da atividade neuronal tardia, no MnPO e apresentaram elevação da pressão arterial (Budzikowski et al, 1998). Estudos sugerem a presença do transportador  $K^+/Cl^-$  em neurônios do MnPO, segundo estes estudos, o transportador  $K^+/Cl^-$  tem papel importante na neurotransmissão inibitória mediada por GABA (ácido gama-aminobutírico) e na ativação de componentes opioides em resposta a variações da osmolaridade (Grob & Mougnot, 2005; Henry et al, 2008). Animais depletados de sódio que receberam microinjeções no MnPO de losartan, apresentam diminuição na ingestão de salina hipertônica quando comparados a animais depletados de sódio que receberam microinjeções de AII ou salina isotônica (Lucca Jr & Francis, 2004). Este resultado parece indicar que a AII no MnPO estimula a ingestão de sódio e que esta área participa do circuito neural de controle do apetite por sódio modulado por AII (Lucca Jr & Francis, 2004). O MnPO também participa dos mecanismos de controle pressão

sanguínea, e muitos estudos mostram a modulação por AII para a regulação cardiovascular (Tanaka et al, 1992; Budzikowski & Leenen, 2001, Crews & Rowland, 2005).

Outra estrutura envolvida é o leito da estria terminal (BST). Estudos mostram que esta área apresenta elevada expressão de c-Fos em resposta a injeção intravenosa de AII, é ativada por neurônios sensíveis a AII como o SFO, OVLT, neurônios noradrenérgicos e recebe projeções de neurônios sensíveis a aldosterona (HSD2) do NTS (Fitzsimons, 1998; Geerling & Loewy, 2008; Greeling et al., 2006). O núcleo accumbens (NAc), área envolvida com os mecanismos de motivação e recompensa, parece estar envolvido na rede neural de controle da homeostasia hidrossalina. Animais depletados de sódio apresentam elevada expressão de c-Fos no NAc após ingestão de salina hipertônica (Voorhies & Bernstein, 2006). Em outro estudo, depois de repetidas depleções, animais que ingeriram salina hipertônica apresentam aumento da expressão de c-Fos no NAc (Na et al, 2007). Os circuitos neurais que detectam a necessidade de sódio e dirige o apetite por este íon compartilham componentes com circuitos associados com a recompensa e motivação (Jonhson & Gross, 1993; Daniels & Fluharty, 2004). O apetite por sódio é um comportamento que pode ser definido como de busca e recompensa, assim, a informação do sabor salgado é transmitida a circuitos cerebrais envolvidos com comportamentos motivacionais (Krause & Sakai, 2007). Há sugestões de que a hiponatremia persistente pode induzir características associadas ao comportamento depressivo, como induzir a plasticidade neuronal em áreas cerebrais envolvidas com a motivação, recompensa e sensibilização às drogas como o núcleo accumbens (NAc) (Geerling & Loewy, 2008). Dados da literatura mostram que a ingestão de sal pode ser aumentada por estimulação elétrica ou diminuída por lesões envolvendo os núcleos da amígdala e que estes núcleos têm importante papel no apetite por sódio induzido por AII (Fitzsimons, 1998), além disto, esta área apresenta neurônios HSD2, altamente sensíveis a aldosterona (Geerling et al., 2006). Estudos do laboratório de Neurociências (ICS-UFBA) mostram a participação dos receptores serotoninérgicos nos núcleos central e medial da amígdala (CeA e MeA, respectivamente). Animais hiponatrêmicos que receberam microinjeções na CeA de m-clorofenilbiguanida (m-CPBG), agonista dos receptores serotoninérgicos do tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>), apresentam forte inibição da ingestão de salina hipertônica, enquanto o pré-tratamento com ondasetrona, antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub>, reverte o efeito antinatriorexigênico do m-CPBG. Em outro estudo, microinjeções de m-CPBG na MeA promove significativa inibição do apetite por sódio e o pré-tratamento com o antagonista ondasetrona reverte o efeito

anitinatriorexigênico(Luz et al, 2006, 2007). Este conjunto de dados corrobora a participação de estruturas relacionadas a fatores emocionais com a regulação do apetite por sal.

### **IV.3-Protocolos Experimentais para Indução do Apetite por Sódio**

Os métodos experimentais para induzir o apetite por sódio levam horas ou dias para produzir um estado fisiológico e neural associado a este comportamento. A ingestão de sódio é dirigida pela deficiência orgânica deste íon (Geerling & Loewy, 2008).

Estudos pioneiros para o entendimento do apetite por sódio, realizados por Richter na primeira metade do século XX, utilizaram a adrenalectomia. Em estudo recente, ratos adrenalectomizados apresentam robusta ingestão de solução salina 0,03M, cerca de 15 ml, antes da remoção das adrenais a ingestão de salina hipertônica variou entre 0 e 3ml, neste estudo, quando estes animais são submetidos à privação de salina hipertônica por 12 horas, ingerem grande quantidade de salina hipertônica (Bykowski et al, 2007). Outro método bastante utilizado é a injeção de AII. Diversos trabalhos mostram que injeção i.c.v de AII estimula a ingestão de água e sal. Todos os componentes do sistema renina-angiotensina são sintetizados no cérebro, e os receptores AT<sub>1</sub> distribuídos em regiões cerebrais importantes no balanço hidrossalino e regulação cardiovascular (McKinley et al, 2003).

AII e mineralocorticóides podem agir simultaneamente na indução do apetite por sódio. Estudos têm mostrado que o tratamento com aldosterona promove um aumento número de receptores AT<sub>1</sub> (Geerling& Loewy, 2008), outros mostram que injeções periféricas do mineralocorticóide sintéticoacetato de deoxicorticosterona(DOCA) aumenta a ingestão de salina hipertônica induzida por AII (Thornton et al, 2007). Animais tratados com baixas doses de mineralocorticóides e de AII promovem robusto apetite por sódio (Daniels & Fluharty, 2004 Morris et al, 2008), estes estudos corroboram a hipótese de que AII e mineralocorticoides podem agir sinergicamente. Segundo a hipótese da sinergia a ação conjunta destes hormônios dirige robusta ingestão de solução salina hipertônica(Geerling& Loewy, 2008),

A furosemida é um potente diurético de alça que produz natriurese minutos após a administração e tem início rápido de ação e curta duração. A furosemida bloqueia o sistema co-transportador de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, localizado na membrana celular luminal do ramo ascendente



da alça de Henle, resultando em excreção de água e eletrólitos em consequência disto há redução de volume líquido corporal e dos níveis de sódio, o que estimula o sistema renina-angiotensina-aldosterona. AII e ALDO são os principais indutores do apetite por sódio. Para induzir o apetite por sódio o uso da furosemida é associado a dieta pobre deste íon, assim, a possibilidade do animal reestabelecer os níveis perdidos de sódio pela alimentação é anulada o que potencializa a hiponatremia promovida pelo uso da furosemida. No presente estudo, foi esta a metodologia utilizada para induzir o apetite por sódio, por ser notoriamente conhecida pela eficiência em induzir este comportamento e não comprometer o bem estar do animal. A dose de furosemida utilizada foi vista em diversos estudos, bem como, em estudo realizado no laboratório de Neurociências, onde a dose utilizada foi eficiente em promover depleção de sódio e hiponatremia (Castro, L et al, 2003). A administração da furosemida em associação com o captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) consiste em outro protocolo utilizado, o FURO/CAP. Este protocolo inibe a formação de AII periférica por inibir a síntese de ECA, contudo, induz a rápida ingestão de sódio, pois promove, em pouco tempo, a síntese de AII central, induzindo o apetite por sódio; a principal vantagem deste protocolo é o curto período de tempo para induzir o comportamento (Pereira, DTB et al, 2010).

Outro protocolo utilizado para induzir o apetite por sódio é a restrição hídrica. Este modelo é compatível com a desidratação do LEC e permite a realização das sessões experimentais do apetite por sódio após o animal saciar a sede, assim, a ingestão de salina hipertônica durante este período de tempo não é confundida com a resposta para a sede. A principal vantagem deste protocolo é a separação dos comportamentos sede e apetite por sódio e a identificação do estado cerebral associado ao apetite por sódio. (Vendramini et al, 2009, De Luca Jr et al, 2010).

#### **IV.4- Interleucina-1: características biológicas**

Os peptídeos da família IL-1 apresenta onze membros identificados e suas funções não estão restritas apenas a resposta inflamatória (Watkins et al, 1999; Dinarello, 2011a). O termo IL-1 é utilizado para descrever as duas formas ativas, a interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), e apesar da proximidade evolutiva, são codificados por dois genes distintos (Dinarello, 1996). Diversos tipos celulares sintetizam IL-1, dentre estes destacam,

na periferia, macrófagos, monócitos e fibroblastos, e no SNC, neurônios, astrócitos e células gliais. A IL-1 é sintetizada como proteínas precursoras com peso molecular de 31KD (pro-IL-1), sendo necessária clivagem por proteases específicas para se transformar em proteínas maduras de 17KD (Watkins et al, 1999; Carruth et al, 1990; Dinarello, 1996). A pró-IL-1 $\alpha$  é clivada pela calpaina e a pro-IL-1 $\beta$  é clivada pela caspase-1 (Carruth et al, 1990; Kalf et al, 1996; Dinarello, 2011a).

A IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  apresentam funções biológicas similares e as exercem através do receptor de membrana IL-1R, este se associa a proteína acessória do receptor (IL-1-RAcP) formando um complexo essencial a transdução de sinais (O'Neill & Dower, 2001; Allan et al, 2005), outro receptor foi identificado, o IL-1R2, contudo, não apresentam mecanismos de sinalização intracelular pois falta o domínio citoplasmático, o que o categoriza como um receptor “decoy” (Watkins et al 1999; Allan et al, 2005; Akhabir & Sandford, 2010; Dinarello, 2011b). Os receptores da família IL-1 pertencem à superfamília “Toll-like” e são importantes para desencadear várias respostas imunológicas como ativação do fator de transcrição nuclear kB (NF- kB) quanto proteínas cinases ativadas por mitógenos relacionados ao estresse (MAPKs) (Allan et al, 2005), além disto, são essenciais na ativação da resposta imune inata pelo reconhecimento de agentes invasores (Takeda & Akira, 2004). O antagonistas do receptor IL-1R incluem a única isoforma secretada (sIL-1RA), e outras três isoformas intracelular, icIL-1RA1, icIL-1RA2, icIL-1RA3. Evidências apontam que sIL-1RA como antagonista competitivo do receptor IL-1R (Arend & Guthridge, 2000; Malyak et al, 1998). A manutenção do equilíbrio entre IL-1 e sIL-1RA é importante na prevenção do desenvolvimento ou progressão de doenças inflamatórias (Irikura et al, 2002; Sgroi et al, 2010; Dinarello, 2011b).

A interleucina-1 (IL-1) tem papel fundamental no desenvolvimento de respostas patofisiológicas a infecção e a inflamação (Dinarello, 1996). É produzida em resposta a diversos estímulos inflamatórios e infecciosos e junto com outras citocinas pró-inflamatórias participa das respostas aos eventos imunes agudos e crônicos (Netea et al, 2010). A estimulação e a liberação das citocinas pró- inflamatórias é essencial para resposta imune inata e a subsequentemente resposta imune adaptativa (Dinarello, 1996). A IL-1 não participa apenas dos eventos que antecipam a inflamação e o controle destas respostas, esta citocina estimula a síntese de prostaglandinas por muitos tipos de células, e algumas ações metabólicas, fisiológicas e hematopoiéticas contam com a participação da IL-1 (Dinarello,

2011b). A IL-1 $\beta$  é a forma mais sintetizada, embora encontrada em níveis baixos no plasma, sua síntese é aumentada durante processos inflamatórios (Rothwell, 2003).

#### **IV.5- Interleucina-1 $\beta$ e o Sistema Nervoso Central**

Por muitos anos o cérebro foi considerado um órgão imunologicamente privilegiado devido ausência de resposta imune clássica a antígenos exógenos (Lotan & Schwartz, 1994), contudo, a vigilância imunológica do SNC ocorre, embora de forma diferente da que se processa na periferia (Allan et al, 2005). As respostas imunológicas detectadas nesta área compartilham sinais moleculares e receptores comuns aos sistemas imunológico e nervoso, além disto, células como astrócitos e micróglia sintetizam, liberam e respondem aos mediadores clássicos da resposta imune como as citocinas, eicosanóides, proteínas de fase aguda e complemento (Licinio & Wong, 1997; Matyszak, 1998; Galea et al, 2006). Os membros da família IL-1 estão presentes no cérebro em baixas ou indetectáveis concentrações (Allan et al, 2005). Algumas atividades fisiológicas normais parecem ser acompanhadas pela expressão de citocinas e após estímulos específicos ou surgimento de doenças, os níveis destas citocinas podem ser aumentados rapidamente (Vitkovic et al, 2000). Citocinas produzidas por neurônios e células gliais podem participar de inúmeras e complexas respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais à infecção e inflamação (Licinio & Wong, 1997). A IL-1 pode modular diversas funções homeostáticas controladas pelo SNC e, acessar este sistema por três possíveis rotas: via nervos periféricos, via segundos mensageiros ativados por células endoteliais centrais, acessar diretamente o parênquima cerebral desde que haja quebra temporária da barreira hematoencefálica, semelhante ao que ocorre em processos infecciosos, ou acessar áreas fora desta barreira (Licinio & Wong, 1997; Allan & Rothwell, 2003). No SNC a IL-1 $\beta$  atua na sinalização intracelular na infecção e lesão tecidual, sendo desta forma importante na comunicação entre o SNC e imune (Watkins et al, 1999). O receptor IL-1R foi encontrado em diferentes regiões do SNC sendo abundante no hipocampo e em áreas hipotalâmicas (Rothwell & Hopkins, 1995; Diana et al, 1999). Após injeções periférica e central de LPS se observa expressão de IL-1 em várias partes do cérebro como o córtex, cerebelo e hipocampo (Quan et al, 1993).

Estudos farmacológicos e eletrofisiológicos têm mostrado a participação da IL-1 $\beta$  em várias funções neuroendócrinas, como ativação do eixo hipotálamo-hipófise adrenal em

resposta ao estresse (Gadek-Michalska et al, 2011), na liberação e ativação de alguns neurotransmissores como a serotonina, dopamina e noradrenalina (Shintanni et al, 1993) e neuromoduladores como óxido nítrico (Monroy et al, 2001) e alteração do estado de excitabilidade neuronal (Pinteaux et al, 2008). Estudos mostram a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pela IL-1 $\beta$ . Animais submetidos ao estresse de contenção por três dias consecutivos apresentaram níveis plasmáticos aumentados de IL-1 $\beta$ , hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona e elevada expressão de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal, hipotálamo e hipocampo (Gadek-Michalska et al, 2011). Após injeções periférica e central (i.c.v) de IL-1 $\beta$  há aumento nos níveis do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e ACTH, contudo em animais que receberam injeções i.c.v de IL-1 $\beta$  este aumento é mais significativo (Van der Meer et al, 1996). Animais não submetidos à remoção da AP, que receberam injeção periférica IL-1 $\beta$ , apresentam níveis aumentados de ACTH e CRH e aumento na expressão de c-Fos no NTS, PVN, CeA e BsT, enquanto animais submetidos a remoção da AP, apresentam níveis discretos deste hormônios e diminuição da expressão de c-Fos no NTS. Segundo este estudo, a AP e o NTS são áreas importantes na sinalização da IL-1 periférica e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por esta citocina (Lee et al, 1998).

Dados da literatura mostram ações da IL-1 $\beta$  sobre a liberação de monoaminas centrais; a administração de IL-1 $\beta$  no hipotálamo anterior induz a liberação de serotonina, dopamina e noradrenalina e seus respectivos metabólitos. Neste estudo, cortes do hipotálamo tratados com IL-1 $\beta$  *in vitro* apresentam liberação destas monoaminas de maneira dose dependente (Shintani et al, 1993). A administração periférica de LPS e de IL-1 $\beta$  induz aumento na concentração extracelular de serotonina e de seu metabólito no hipotálamo (Linthorst et al, 1995) e parece que a IL-1 $\beta$  é importante na regulação do transportador de serotonina (Ramamoorthy et al, 1995). Injeções de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal promoveu aumento da síntese de noradrenalina e glutamato e o pré-tratamento com o antagonista IL-1RA não modificou os níveis de noradrenalina (Kamikawa et al, 1998). IL-1 pode alterar o estado de excitabilidade neuronal por estimular a despolarização celular via receptores N-metil-D-aspartato(NMDA) ou inibir a atividade neuronal através da diminuição da liberação de glutamato, diminuição da expressão de receptores alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico(AMPA) e canais de cálcio resultando em diminuição na transmissão sináptica (Pinteaux et al, 2008), microinjeções de IL-1 $\beta$  induzem acentuada despolarização no SFO (Desson & Ferguson, 2003).

#### **IV.6- Interleucina-1 $\beta$ e ingestão de alimentos e água**

A supressão da ingestão de alimentos é comum em animais doentes. A participação da IL-1 $\beta$  na anorexia é observada durante respostas inflamatória aguda e crônica (Gautron & Layé, 2010). Estudos sugerem o envolvimento da IL-1 $\beta$  na mediação de várias alterações metabólicas e nutricionais durante a infecção (Langhans & Hrupka, 1999). A administração periférica de IL-1 $\beta$  ou de estimulantes da liberação de citocinas, como lipopolissacarídeos (LPS), reduz a ingestão e a busca de alimentos (McCarthy et al, 1985; Johnson, RW, 1998). Outro estudo mostra que a injeção periférica de IL-1 $\beta$  reduz a ingestão de alimentos e sugere que este efeito anorexigênico é mediado por prostaglandinas (Hellerstein et al, 1989). A presença de patógenos induz a síntese de IL-1 $\beta$  por leucócitos e por consequência há reduçãoda busca e a ingestão voluntária de alimentos (Parnet et al, 2002).Outro mediador envolvido na resposta anorexigênica é a colecistocinina (CCK). A administração intravenosa de CCK aumenta a ativação das vias aferentes do nervo vago, esta resposta foi potencializada após injeção intravenosa de IL-1 $\beta$  (Bucinskaite et al, 1997), em outro estudo, o pré-tratamento com antagonista do receptor CCK tipo A (CCK<sub>A</sub>) L-364-718 (devaizepida) diminui a atividade aferente vagal gástrica induzida por IL-1 $\beta$  (Kurosawa et al, 1997). Estes resultados sugerem que as ações da IL-1 $\beta$  sobre o comportamento alimentar podem ser mediadas por CCK.

A ativação de fibras neurais por citocinas sintetizadas na periferia não é crucial para o efeito anorexigênico observado durante a ativação do sistema imune, entretanto IL-1 $\beta$  circulante pode agir diretamente sobre o cérebro ou a síntese de citocinas no cérebro pode contribuir fortemente para o efeito anorexigênico durante a estimulação do sistema imune (Langhans & Hrupka, 1999). Estudos mostram efeito anorexigênico e antidipsogênico promovido por microinjeções de IL-1 $\beta$  em áreas do SNC. Microinjeções de IL-1 $\beta$  na região ventromedial do globo pálido ou no núcleo accumbens de ratos privados de alimentos ou água por 24 horas inibe a ingestão de alimentos e água (Káradi et al, 2005; Takács et al, 2010). Microinjeções de IL-1 $\beta$ , no hipotálamo ventromedial (VMH) inibe a ingestão água e alimentos e este efeito antidipsogênico e anorexigênico é acompanhado de perda de peso (Kent, et al, 1993).

Dados da literatura evidenciam o efeito antidipsogênico da IL-1 $\beta$  em nível periférico e central. A administração periférica de IL-1 $\beta$  resultou em supressão da ingestão de alimentos,

de água e diminuição da excreção de sódio e potássio, mas não alterou o volume urinário, além disto, a excreção de sódio induzida pela IL-1 $\beta$  foi abolida em animais renal desnervado (Kannan et al, 1996). A administração periférica de IL-1 $\beta$ , em animais que receberam injeção intraperitoneal de salina hipertônica inibe a ingestão de água (Osaka et al, 1992), em outro estudo, uma cepa de camundongos polidipsicos não responde a IL-1 $\beta$  tanto a nível central quanto em nível da resposta imune (Okada et al, 1999). Injeções i.c.v de IL-1 $\beta$  inibe a ingestão de água e o pré-tratamento com o antagonista IL-1RA bloqueia o efeito antidipsogênico induzido pela IL-1 $\beta$  (Plata-Salaman & French-Mullen, 1992). Estudos do laboratório de Neurociências mostram que injeções i.c.v de IL-1 $\beta$  promovem efeito antinatriorexigênico e antidipsogênico, em animais depletados de sódio e submetidos a três protocolos indutores de sede: privação hídrica, hiperosmolaridade e hipovolomia, respectivamente, e sugerem que estes efeitos parecem depender de opioides centrais (De Castro e Silva et al, 2006; Luz et al, 2009), indicando possível participação da IL-1 $\beta$  na regulação da ingestão de água pelo SNC. A investigação do papel inibitório da IL-1 $\beta$  sobre a ingestão de alimentos e água é importante especialmente frente a processos inflamatórios onde esta citocina é naturalmente liberada. Assim sendo, diante dos notórios efeitos da IL-1 $\beta$  sobre diversas ações controladas pelo SNC, sua associação a doenças de alta frequência e a escassez de estudos mostrando a participação da IL-1 $\beta$  na regulação central do apetite por sódio, especialmente em áreas específicas como o MnPO e o SFO, o presente estudo é de fundamental importância, pois fornece valiosa contribuição do envolvimento desta citocina sobre a homeostasia hidrossalina.

## V. OBJETIVO E HIPÓTESES

### OBJETIVO

Investigar o efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  no MnPO e no SFO sobre o apetite por sódio em animais submetidos a depleção deste íon.

### HIPÓTESES

- **Hipótese nula (H<sub>0</sub>):** IL-1 $\beta$  em áreas como núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e órgão subfornical (SFO), **não está envolvida** na regulação central por apetite por sódio.
- **Hipótese teste (H<sub>1</sub>):** A IL-1 $\beta$  **está envolvida** na regulação central do apetite por sódio.

## VI. MATERIAIS E MÉTODOS

### VI.1- Animais

No presente estudo, foram utilizados ratos Wistar, com peso entre 250 a 270 gramas, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia. Os animais foram mantidos em sala com temperatura de  $22 \pm 2$  °C e luz controlada com período de claro/escuro de 12 horas (luz das 07h às 19h) com ração (Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, Brasil), água destilada e salina hipertônica (1,5%) *ad libitum*. O número de animais utilizados nos experimentos foi previamente calculado e os protocolos experimentais estão de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ICS-UFBA) para apreciação e subseqüente autorização.

### VI.2- Cirurgia estereotáxica

Para realização da cirurgia estereotáxica os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal (i.p.), com cetamina - xilazina (80-7mg/kg). A seguir, foram tricotomizados e colocados no aparelho estereotáxico para implante de cânula guia no MnPO ou SFO. Para canulação do MnPO utilizou-se cânula de 14 mm, seguindo as coordenadas estereotáxicas: anteroposterior -0,26 mm posterior ao bregma, lateral 0,0 mm e vertical -5,8 mm a partir da calota craniana. Para canulação do SFO utilizou-se cânula de 13 mm, com anteroposterior -0,9 mm, lateral 0,0 e, vertical - 4,8 mm. (Watson e Paxinos, 1998).

As cânulas utilizadas na cirurgia central foram confeccionadas com agulhas hipodérmicas de aço inoxidável, com diâmetro de 0,7 mm, fixadas no crânio comacrílico dentário auto-polimerizante. Após este procedimento, a cânula foi ocluída com mandril removível confeccionado com fio de aço inoxidável, a fim de prevenir a obstrução da mesma. Ao final da cirurgia os animais receberam doses profiláticas de pentabiótico veterinário Fort-Dogde (Benzilpenicilina benzatina; Benzilpenicilina procaína; Benzilpenicilina potássica; Diidroestreptomicina base; Estreptomicina base), na dose de 0,2 ml/Kg, e anti-inflamatório e analgésico flunixinina meglumina e na dose de 0,1 ml/100g, ambos por via intramuscular (i.m.). Ao acordarem da cirurgia, os animais foram alojados em caixas plásticas individuais, onde



foram manipulados diariamente durante o período de recuperação cirúrgica, em uma simulação das condições experimentais aos quais serão submetidos, a fim de reduzir o estresse. As caixas, os mandris, os bebedouros de água destilada e salina hipertônica (1,5%) foram trocados diariamente. No quinto dia foram realizadas as sessões experimentais.

### **VI.3- Drogas e microinjeções**

Foram utilizadas as seguintes drogas: Interleucina-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ , recombinante humana – derivada de *Escherichia coli*) nas doses 0,4, 0,8 e 1,6 ng/rato, furosemida (Lasix), na dose de 20mg/rato e solução fisiológica isotônica (NaCl 0,9%) como veículo. As microinjeções centrais foram efetuadas através de uma seringa de 10  $\mu$ l (Hamilton, Co. Inc. Whittier, C.A.) conectada a uma agulha odontológica n° 30G com 16 mm (MnPO) ou 14 mm (SFO), através de um tubo de polietileno (PE10). O volume total injetado foi de 0,2  $\mu$ l durante aproximadamente sessenta segundos.

### **VI.4- Histologia**

Após as sessões experimentais os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia por perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% seguida por formol 10%, após o procedimento, os cérebros foram removidos e mergulhados em solução salina 0,9% e refrigerados, 24 horas depois, transferidos para solução de formol glicosado a 30%, onde ficaram estocados e refrigerados por 48 horas. Após este período os cérebros foram cortados por técnica de congelamento no criostato, organizados em lâminas com gel e então conduzidos para secagem na estufa. Após secagem, as lâminas foram coradas com cresil violeta para verificação do posicionamento das cânulas. Apenas os dados referentes aos ratos cuja cânula estava no MnPO ou SFO foram utilizados.

## **VI. 5-PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS**

### **VI. 5.1-Depleção de sódio**

Quatro dias após a cirurgia os animais foram submetidos à depleção de sódio, para isto, receberam injeção subcutânea (s.c) de furosemida (20 mg/Kg) ou salina 0,9 % (grupo normonatrêmico). A diurese foi monitorada por observação e as caixas trocadas constantemente. Ao final da diurese promovida pela furosemida, os animais foram transferidos para uma caixa com maravalha e mantidos com alimento hipossódico (0,001% Na<sup>+</sup> e 0,33%K<sup>+</sup>) e água destilada por 24 horas. No dia seguinte foi realizada a sessão experimental, onde os animais receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  no MnPO ou SFO nas doses de 0,4, 0,8 e 1,6 ng/ratãoe salina isotônica estéril (0,9%) para os grupos controles depletados e normonatrêmicos. Após 15 minutos da injeção os bebedouros graduados com água destilada e com solução salina hipertônica (1,5%) foram oferecidos aos animais. O monitoramento da ingestão de água destilada e de solução salina teve início 5 minutos após a oferta dos bebedouros e continuou por duas horas, até o final das sessões experimentais. O monitoramento da ingestão de água destilada e salina hipertônica ocorreu nos tempos determinados no protocolo experimental. Todos os experimentos foram realizados entre 7h e 11h e os animais não tiveram acesso a ração durante este período. Para realização deste protocolo experimental, o grupo de animais que recebeu implante de cânula no MnPO ou SFO foi submetido a 3 experimentos. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em 2 grupos e cada grupo recebeu uma das 3 doses de IL-1 $\beta$  ou salina estéril no MnPO ou SFO. Ao final dos três experimentos, todos os animais haviam recebido os 3 tratamentos. Um grupo normonatrêmico, isto é, sem depleção de sódio, recebeu microinjeções de salina estéril no MnPO e SFO. Após a realização destas sessões experimentais, foram realizados testes para comprovar a viabilidade da droga e a especificidade dos resultados obtidos.

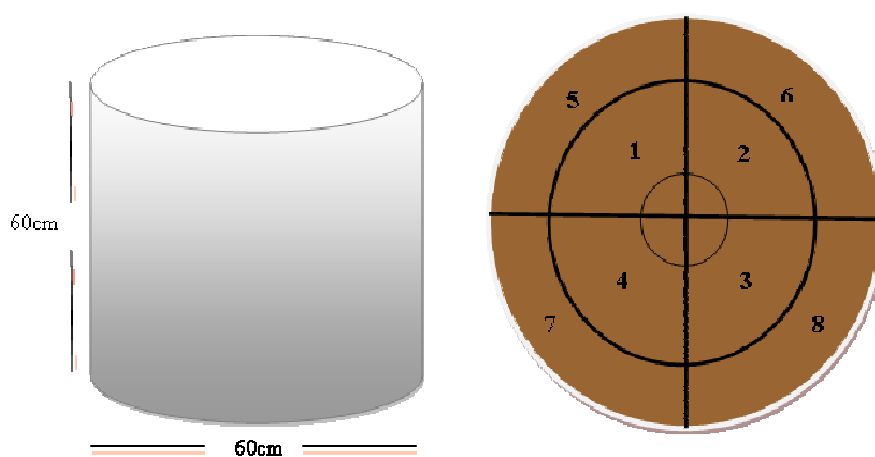
### **VI. 5.2-Teste de sobremesa**

Consistiu em oferecer solução sacarina 0,1% aos animais e verificar se a microinjeção de IL-1 $\beta$  alteraria a preferência dos animais em ingerir uma solução palatável. Este protocolo está bem estabelecido na literatura e ilustra um comportamento hedônico em ratos (Johnson & Schwob, 1975). Durante o período de habituação os animais foram transferidos para uma caixa forrada com papel branco (caixa teste) cuja função era sinalizar a oferta de um novo

bebedouro. Esta habituação foi realizada por duas horas durante 5 dias, neste período, os animais recebiam dois bebedouros: o de água filtrada e o de solução sacarina 0,1%. Ao final deste período de teste, os animais foram transferidos para suas caixas originais, contendo apenas o bebedouro de água filtrada e ração. No quinto dia os animais foram privados de água por 24 h e passado este período, receberam microinjeção, no MnPO ou SFO, de IL-1 $\beta$ , na dose de 1,6 ng/rato ou salina isotônica estéril. Após as microinjeções os animais foram colocados nas caixas testes e após 15 minutos, receberam bebedouros de água filtrada e de solução sacarina 0,1%. O registro dos volumes ingeridos foi iniciado 5 minutos após a oferta dos bebedouros e mantido por 120 minutos até o término da sessão experimental.

### VI. 5.3- Teste do campo aberto

Para observar o efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  no MnPO ou SFO sobre a atividade locomotora dos animais depletados de sódio, realizou-se o teste do campo aberto. Para este teste foi utilizada uma caixa circular com fundo de acrílico, de 60 cm de diâmetro e 60 cm de altura, com uma abertura superior, e base dividida em oito áreas de mesmo tamanho (42,43 cm). 24 horas após a depleção os animais receberam microinjeção de IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng/rato, grupo experimental, e de solução salina estéril, grupo controle. Após 45 minutos da microinjeção, os ratos foram colocados no centro da caixa e tiveram o deslocamento quantificado à medida que colocavam as quatro patas dentro dos limites de cada área. Este teste teve duração de 15 minutos.



Desenho esquemático da caixa utilizada para o teste do campo aberto: áreas percorridas pelos ratos numeradas de 1 a 8

## VI. 5.4- Registro da temperatura corporal

Para testar a viabilidade da droga e mensurar os efeitos da administração central da IL-1 $\beta$  no MnPO e no SFO sobre a temperatura corporal, uma sonda com termômetro, foi inserida 6-7 cm no cólon e presa na base da cauda do rato. O termômetro (Minipa Thermometer, Modelo: MT – 520) foi conectado a um dispositivo digital que registra e exibe as temperaturas continuamente. 30 minutos antes das microinjeções de IL-1 $\beta$  ou solução salina, a sonda com termômetro foi introduzida e após 15 minutos, a temperatura basal foi registrada, em seguida, o grupo experimental recebeu microinjeção de IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng/rato, enquanto o grupo controle recebeu microinjeção de solução salina isotônica. O registro da temperatura se deu 15 minutos após as microinjeções e continuou por 2 horas.

## VI. 5.5- DESENHOS EXPERIMENTAIS

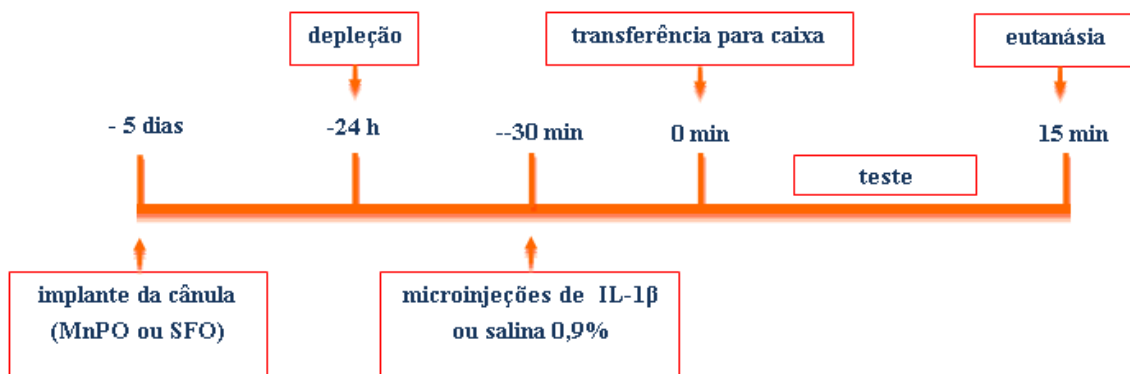
**Protocolo Experimental 01** – Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  (1,6, 0,8 e 0,4 ng/rato) no MnPO ou SFO sobre a ingestão de solução salina hipertônica (1,5%) e de água destilada em ratos depletados de sódio.



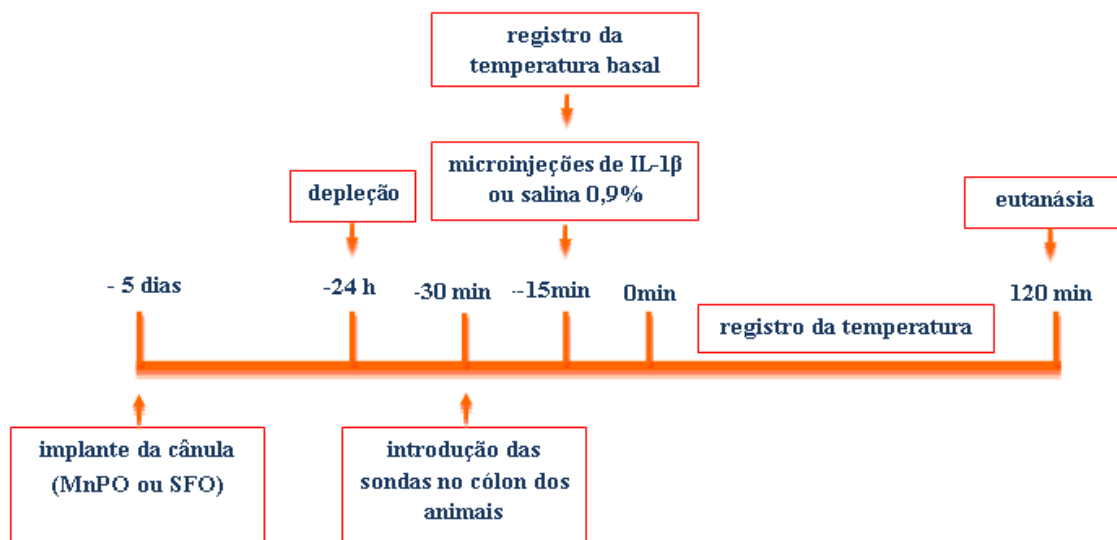
**Protocolo Experimental 02** – teste de sobremesa: ingestão de solução palatável de sacarina (0,1%) e água filtrada em ratos privados de água por 24 horas após microinjeção de IL-1 $\beta$  (1,6 ng/0,2  $\mu$ l) no MnPO ou SFO.



**Protocolo Experimental 03** – teste do campo aberto: efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$  (1,6 ng/0,2  $\mu$ l) no MnPO ou SFO sobre a atividade locomotora dos animais após a depleção de sódio.



**Protocolo Experimental 04** – teste da temperatura corporal: efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$  (1,6 ng/0,2  $\mu$ l) no MnPO ou SFO sobre a temperatura corporal de ratos depletados de sódio.



## VI. 5.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de todos os dados obtidos foi realizada através do programa GraphPad versão 5.0. Para analisar o efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  no MnPO ou SFO sobre o apetite por sódio em ratos depletados deste íon e comparar cada tratamento no tempo correspondente com o grupo controle, utilizou-se ANOVA *one way*, seguida do pós-teste de Student-Newman-Keuls. Os testes de sobremesa e campo aberto foram analisados com o teste t de Student não pareado, pois o objetivo foi comparar dois grupos independentes. Para analisar o efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$  no MnPO ou SFO sobre a temperatura corporal em animais depletados de sódio e comparar o efeito deste tratamento com o grupo controle, utilizou-se ANOVA *two way*, seguida do pós-teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ ; os dados foram apresentados como média e erro-padrão (média  $\pm$  SEM).

## VII. RESULTADOS

### VII.1-Localização das microinjeções de IL-1 $\beta$ ou salina no MnPO e no SFO

Fotomicrografias típicas de cortes de cérebro e diagramas situando as cânulas guias no MnPO e SFO, respectivamente. Os dados dos animais cujas cânulas ficaram fora destas áreas não foram considerados na análise estatística.

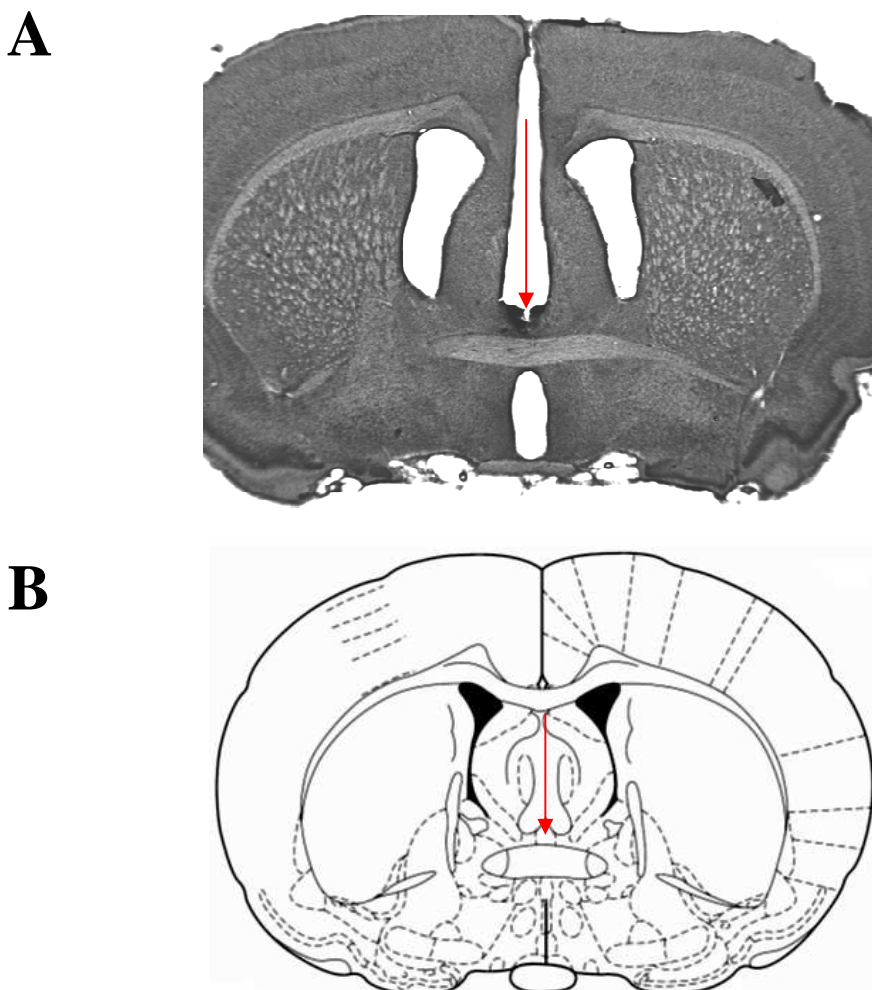
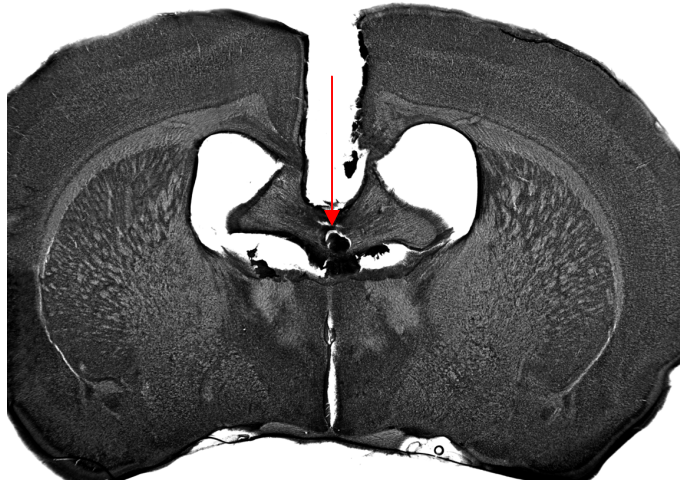
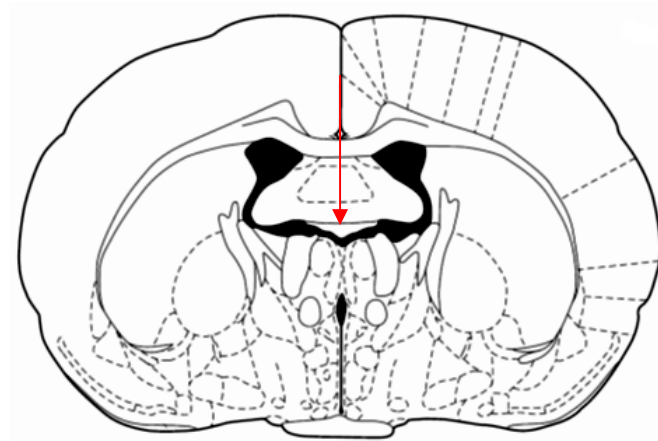


Figura 1. Fotomicrografia típica (A) e diagrama (Watson & Paxinos, 1998) (B) de corte de cérebro de rato mostrando local da microinjeção **no MnPO** (seta vermelha).

**A**



**B**

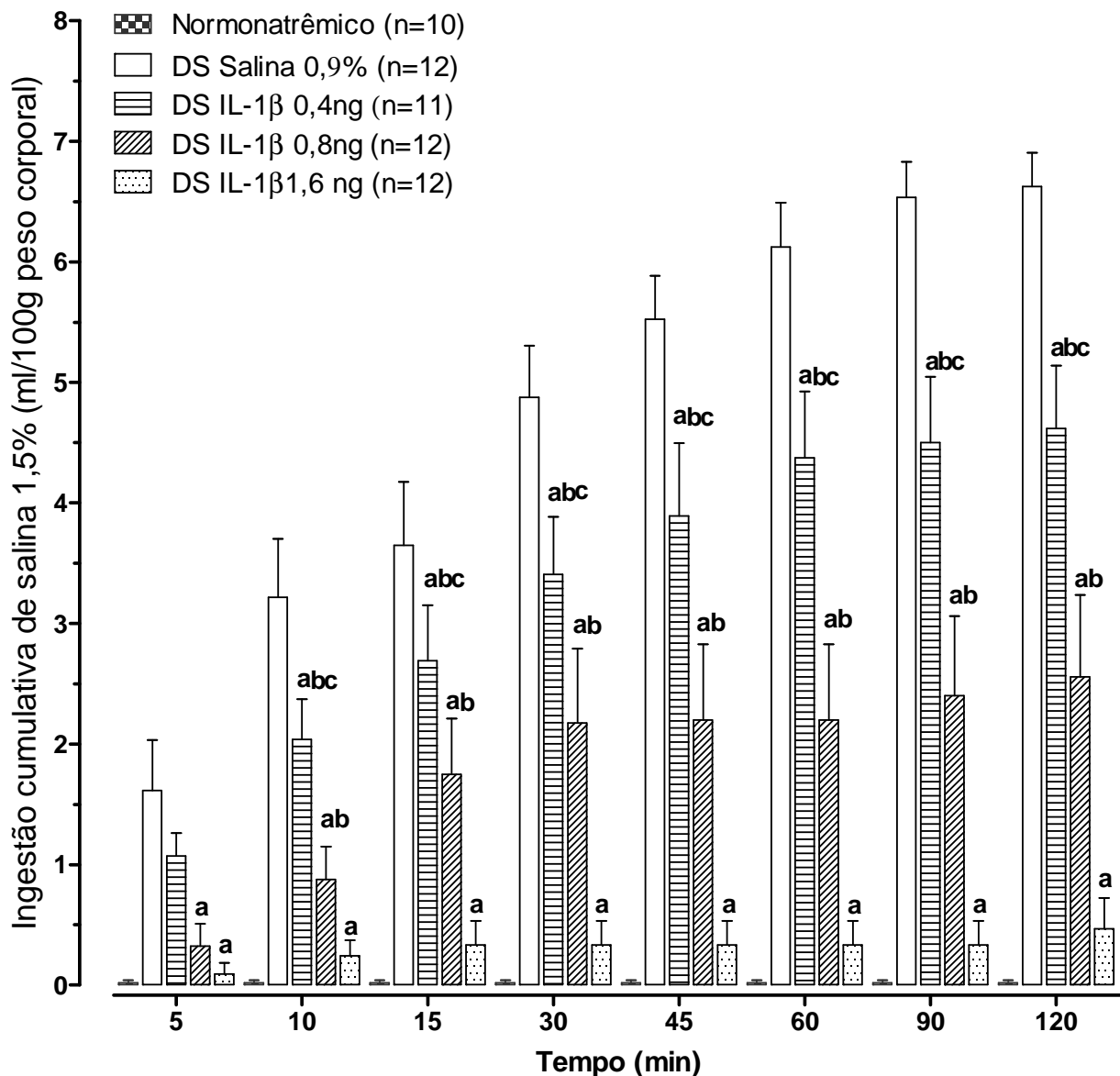


**Figura 2.** Fotomicrografia típica (A) e diagrama (Watson & Paxinos, 1998) (B) de corte de cérebro de rato mostrando local da microinjeção no **SFO** (seta vermelha).



### **Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ no MnPO sobre a ingestão de salina 1,5% em animais depletados de sódio.**

A administração de IL-1 $\beta$  em diferentes doses reduziu de forma dose dependente a ingestão de salina hipertônica e este efeito antinatriorexigêncico perdurou até o final do experimento. Aos 5 minutos observou-se inibição da ingestão de sal por todas as doses de IL-1 $\beta$ , com diferença estatisticamente significativa entre as doses de 0,4 ng/rato e as doses de 0,8 e 1,6 ng/rato. Observa-se diferença também entre o grupo normonatrêmico e os grupos que receberam outros tratamentos exceto com o grupo tratado com IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng/rato, sendo os valores da análise de variância de um fator  $F_{(4,52)} = 8,869$ ;  $p < 0,0001$ . Aos 30 minutos observa-se diferença entre as doses de IL-1 $\beta$ , sendo os valores da ANOVA  $F_{(4,52)} = 23,52$ ;  $p < 0,0001$ ; aos 60 e 120 minutos esta diferença estatisticamente significativa entre as doses se mantêm, sendo os respectivos valores da ANOVA:  $F_{(4,52)} = 37,62$ ;  $p < 0,0001$  e  $F_{(4,52)} = 41,98$ ;  $p < 0,0001$ . Os valores de média e desvio padrão (média  $\pm$  EPM) da ingestão de água e salina hipertônica após microinjeções de IL-1 $\beta$  encontram-se na tabela 1.



**Figura 3.** Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  no MnPO sobre a ingestão de salina 1,5% de ratos depletados de sódio. (a) indica diferença em relação ao controle (salina) depletado sódio (DS). (b) indica diferença em relação IL-1 $\beta$  na dose 1,6 ng. (c) indica diferença em relação a IL-1 $\beta$  na dose 0,8 ng. Os dados foram tratados com ANOVA *one way* seguida do pós-teste de Student- Newman-Keuls;  $p < 0,05$ .

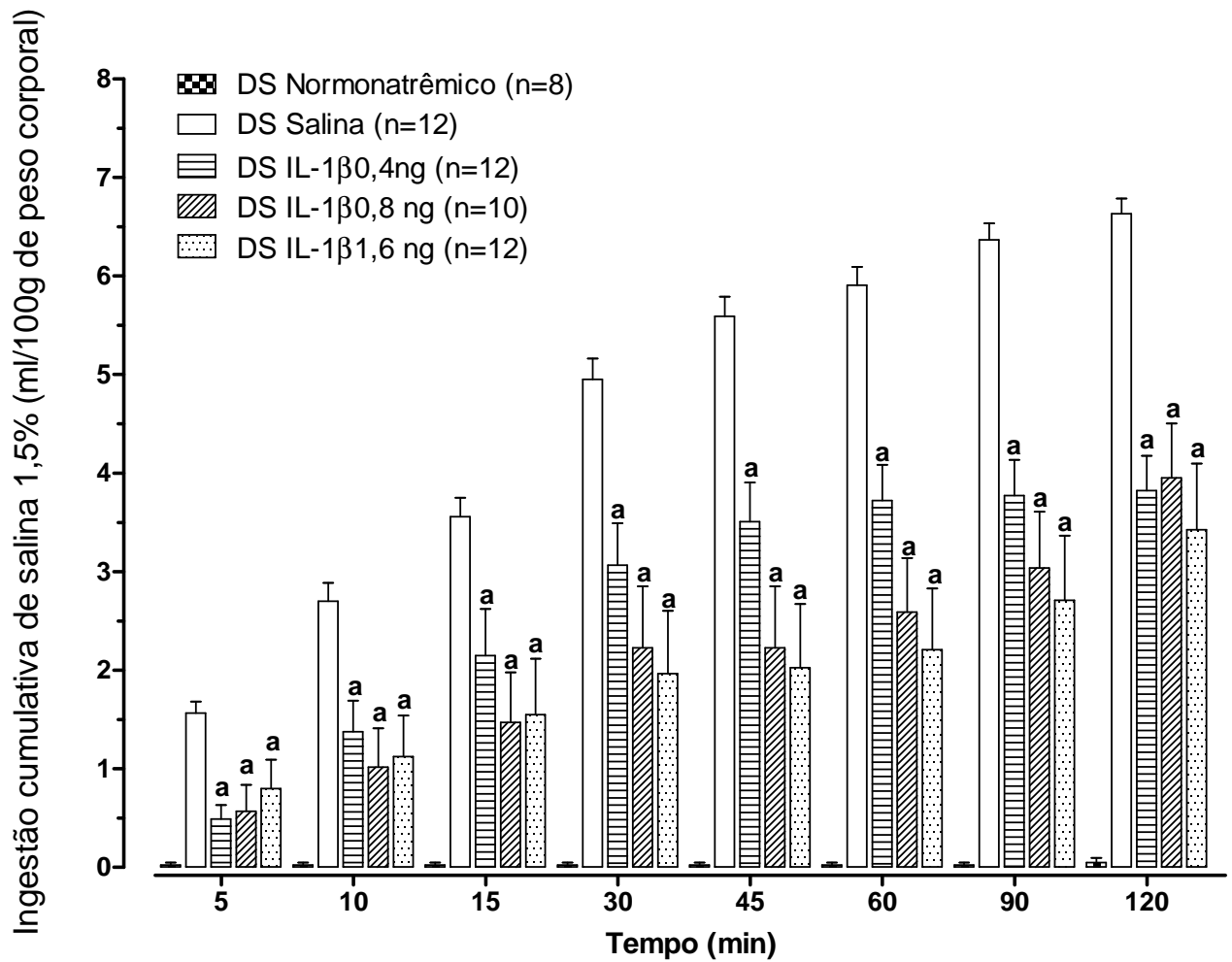
**Tabela 1.** Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  no MnPO sobre a ingestão de água destilada e de salina 1,5% em animais depletados de sódio.

Tratamento	Depleção de sódio									
	Salina (12)		IL-1 $\beta$ 0,4ng (12)		IL-1 $\beta$ 0,8ng (10)		IL-1 $\beta$ 1,6ng (12)		Normonatrêmico (8)	
Tempo	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina
5	0,00 $\pm$ 0,00	1,61 $\pm$ 0,41	0,00 $\pm$ 0,00	1,07 $\pm$ 0,18	0,00 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 0,18	0,00 $\pm$ 0,00	0,92 $\pm$ 0,09	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
10	0,00 $\pm$ 0,00	3,21 $\pm$ 0,48	0,00 $\pm$ 0,00	2,03 $\pm$ 0,33	0,00 $\pm$ 0,00	0,87 $\pm$ 0,67	0,00 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
15	0,00 $\pm$ 0,00	3,65 $\pm$ 0,52	0,00 $\pm$ 0,00	2,69 $\pm$ 0,45	0,00 $\pm$ 0,00	1,70 $\pm$ 0,46	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,19	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
30	0,00 $\pm$ 0,00	4,87 $\pm$ 0,42	0,00 $\pm$ 0,00	3,40 $\pm$ 0,47	0,00 $\pm$ 0,00	2,17 $\pm$ 0,61	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,19	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
45	0,00 $\pm$ 0,00	5,52 $\pm$ 0,36	0,00 $\pm$ 0,00	3,89 $\pm$ 0,60	0,00 $\pm$ 0,00	2,20 $\pm$ 0,62	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,19	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
60	0,00 $\pm$ 0,00	6,12 $\pm$ 0,36	0,00 $\pm$ 0,00	4,37 $\pm$ 0,55	0,00 $\pm$ 0,00	2,20 $\pm$ 0,62	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,19	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
90	0,00 $\pm$ 0,00	6,53 $\pm$ 0,29	0,00 $\pm$ 0,00	4,50 $\pm$ 0,54	0,00 $\pm$ 0,00	2,40 $\pm$ 0,61	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,19	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,03
120	0,00 $\pm$ 0,00	6,25 $\pm$ 0,28	0,00 $\pm$ 0,00	4,60 $\pm$ 0,52	0,00 $\pm$ 0,00	2,55 $\pm$ 0,67	0,00 $\pm$ 0,00	0,47 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,04

Os números de animais utilizados nos experimentos estão indicados entre parênteses. Os dados foram analisados com ANOVA one way seguida do pós-teste Student- Newman -Keuls ( $p < 0,05$ ) e estão representados como média e desvio-padrão (média  $\pm$  SEM).

### **Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ no SFO sobre a ingestão de salina 1,5% em animais depletados de sódio.**

A administração de IL-1 $\beta$  em diferentes doses no SFO inibiu o apetite por sódio e esta inibição perdurou até o final das sessões experimentais. Existe diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados com IL-1 $\beta$  em diferentes doses e os grupos controle e normonatrêmico, contudo, não existe diferença estatisticamente significativa entre as doses de IL-1 $\beta$ . Aos 5 minutos o efeito inibitório já se apresentara e aparentemente a dose maior inibe menos, sendo os valores da análise de variância  $F_{(4,49)} = 7,349$ ;  $p < 0,0001$ . Aos 30 minutos observou-se um discreto aumento na ingestão de sal embora o efeito inibitório da IL-1 $\beta$  em todas as doses ainda era evidente, os valores da ANOVA foram  $F_{(4,49)} = 13,22$ ;  $p < 0,0001$ . Aos 60 e 120 minutos o efeito antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$  se mantém, sendo os valores da ANOVA  $F_{(4,49)} = 17,01$   $p < 0,0001$  e  $F_{(4,49)} = 24,17$   $p < 0,0001$ , respectivamente. Durante as sessões experimentais não foi observada ingestão de água destilada por nenhum dos grupos (tabela 2)



**Figura 4.** Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  no SFO sobre a ingestão de salina 1,5% de ratos depletados de sódio. (a) indica diferença em relação ao controle (salina) depletado sódio (DS). Os dados foram tratados com ANOVA *one way* seguida do pós-teste de Student- Newman-Keuls;  $p < 0,05$ .

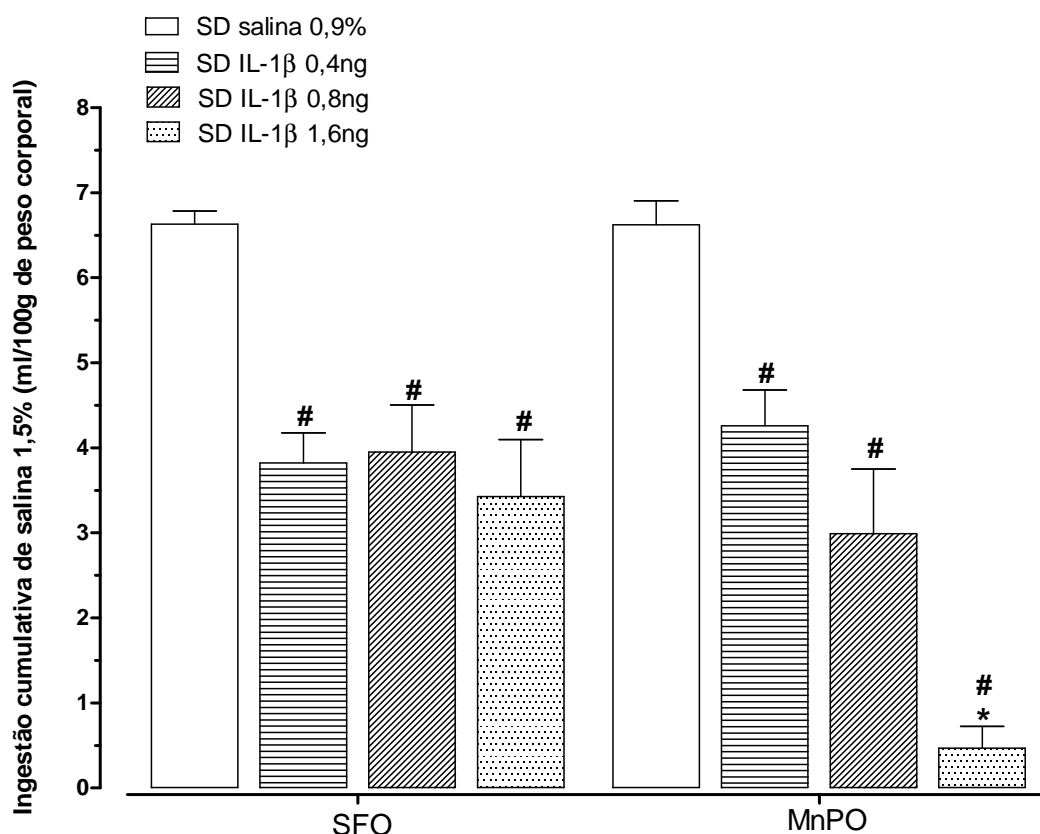
**Tabela 2.** Efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$  (0,4, 0,8 e 1,6 ng/rato) ou salina 0,9% no SFO sobre a ingestão de água destilada e salina 1,5% em ratos depletados de sódio.

Tratamento	Depleção de sódio									
	Salina (12)		IL-1 $\beta$ 0,4ng (12)		IL-1 $\beta$ 0,8ng (10)		IL-1 $\beta$ 1,6ng (12)		Normonatrêmico (8)	
Tempo	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina
5	0,00 $\pm$ 0,00	1,56 $\pm$ 0,11	0,00 $\pm$ 0,00	0,49 $\pm$ 0,14	0,00 $\pm$ 0,00	0,57 $\pm$ 0,27	0,00 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 0,29	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
10	0,00 $\pm$ 0,00	2,70 $\pm$ 0,18	0,00 $\pm$ 0,00	1,37 $\pm$ 0,31	0,00 $\pm$ 0,00	1,02 $\pm$ 0,39	0,00 $\pm$ 0,00	1,12 $\pm$ 0,41	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
15	0,00 $\pm$ 0,00	3,55 $\pm$ 0,21	0,00 $\pm$ 0,00	2,15 $\pm$ 0,47	0,00 $\pm$ 0,00	1,47 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00	1,55 $\pm$ 0,56	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
30	0,00 $\pm$ 0,00	4,95 $\pm$ 0,20	0,00 $\pm$ 0,00	3,06 $\pm$ 0,42	0,00 $\pm$ 0,00	2,23 $\pm$ 0,62	0,00 $\pm$ 0,00	1,96 $\pm$ 0,63	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
45	0,00 $\pm$ 0,00	5,90 $\pm$ 0,18	0,00 $\pm$ 0,00	3,50 $\pm$ 0,39	0,00 $\pm$ 0,00	2,23 $\pm$ 0,62	0,00 $\pm$ 0,00	2,02 $\pm$ 0,64	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
60	0,00 $\pm$ 0,00	6,36 $\pm$ 0,16	0,00 $\pm$ 0,00	3,72 $\pm$ 0,35	0,00 $\pm$ 0,00	2,59 $\pm$ 0,59	0,00 $\pm$ 0,00	2,20 $\pm$ 0,62	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02
90	0,00 $\pm$ 0,00	6,53 $\pm$ 0,29	0,00 $\pm$ 0,00	3,77 $\pm$ 0,36	0,00 $\pm$ 0,00	3,04 $\pm$ 0,57	0,00 $\pm$ 0,00	2,70 $\pm$ 0,65	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,03
120	0,00 $\pm$ 0,00	6,63 $\pm$ 0,15	0,00 $\pm$ 0,00	3,82 $\pm$ 0,35	0,00 $\pm$ 0,00	3,95 $\pm$ 0,55	0,00 $\pm$ 0,00	3,42 $\pm$ 0,67	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,04

Os números de animais utilizados nos experimentos estão indicados entre parênteses. Os dados foram analisados com ANOVA one way seguida do pós-teste Student- Newman -Keuls ( $p < 0,05$ ) e estão representados como média e desvio-padrão (média  $\pm$  SEM).

### Comparação do efeito antinatriorexigêncico da IL-1 $\beta$ injetada no SFO e no MnPO.

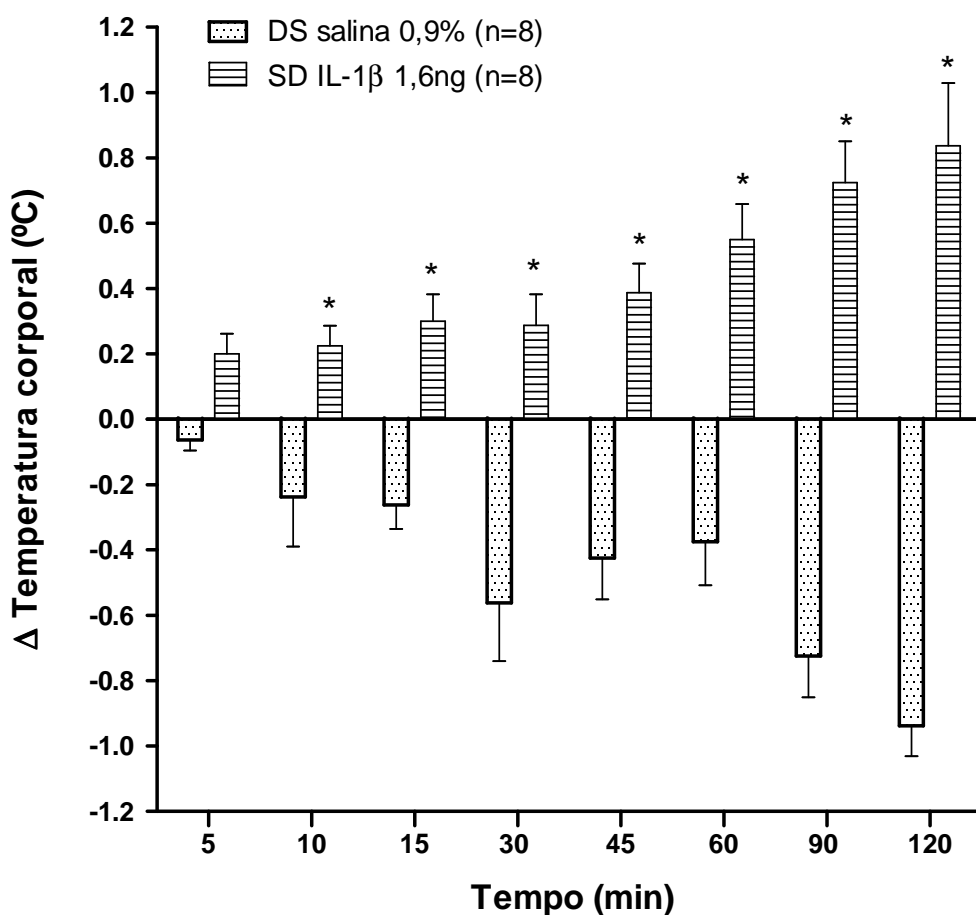
A ingestão de sal do grupo de animais que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  nas doses 0,4, 0,8 e 1,6 ng/rato animalno SFO foi comparada com a ingestão do grupo que recebeu o mesmo tratamento no MnPO. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais que recebeu IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ngno SFO quando comparados com o grupo de animais que recebeu o mesmo tratamento no MnPOsendo a resposta nesta área mais intensa, contudo, não houve diferença entre as demais doses quando injetadas no SFO e MnPO. A análise dos dados foi realizada por meio da ANOVA *one way* [F(7,98) = 23,99; P<0,0001].



**Figura 5.** Comparação da ingestão cumulativa de sal após injeção de IL-1 $\beta$  no SFO e no MnPO (120 minutos). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre as áreas SFO e MnPO tratadas com IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng/rato. Os dados foram tratados com ANOVA *one way* seguida do pós-teste de Student-Newman-Keuls; p< 0,05.

### Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ no MnPO sobre a temperatura corporal de ratos depletados de sódio.

Os animais tratados com IL-1 $\beta$  na dose 1,6 ng/rato, após 10 minutos da administração da droga, apresentaram significativo aumento da temperatura corporal quando comparados aos animais controles tratados com salina 0,9%, esta hipertermia perdurou até o final do experimento, enquanto que nos animais controle a temperatura corporal retornou aos valores basais. ANOVA *two way* mostrou significativo efeito da IL-1 $\beta$  sobre a temperatura corporal [F(1,112) = 233,59; p < 0,0001].

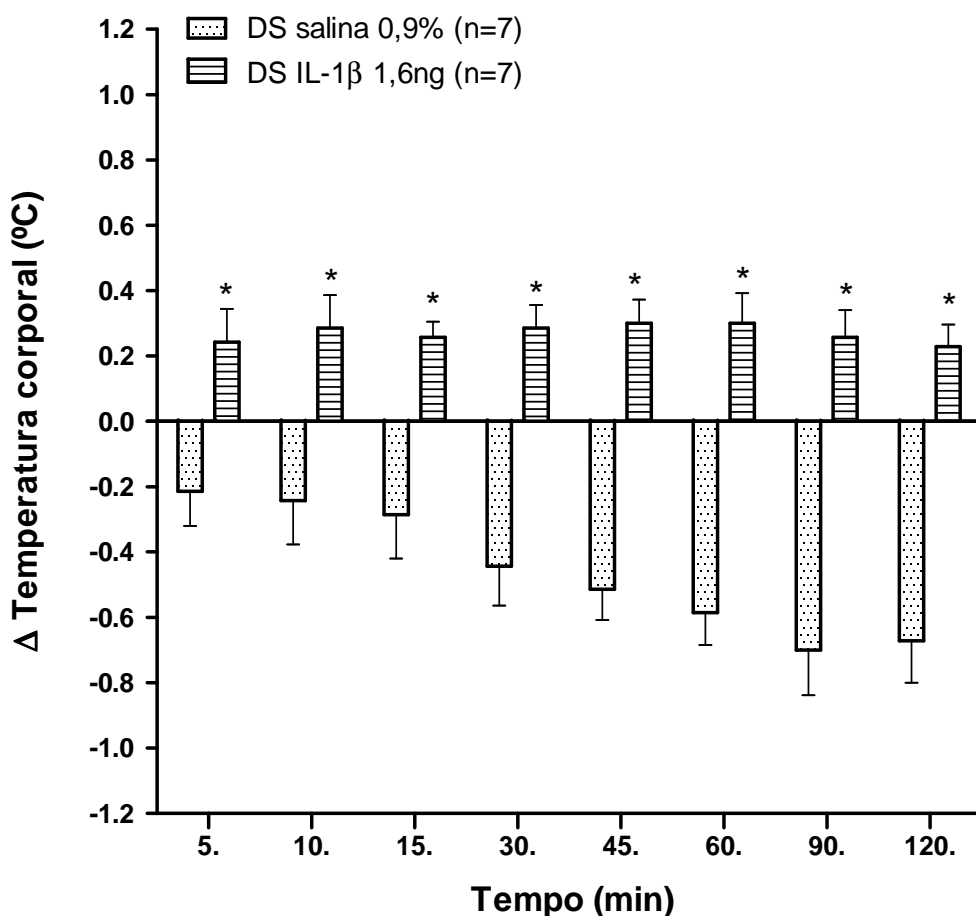


**Figura 6.** Mudanças na temperatura corporal de ratos após microinjeções de IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng/rato ou salina 0,9% no MnPO. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O (\*) indica diferença estatística significativa do grupo tratado com IL-1 $\beta$  comparado ao grupo controle depletado de sódio (DS). (ANOVA *two way* seguida do pós-teste de Bonferroni; p < 0,05).



### Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ no SFO sobre a temperatura corporal de ratos depletados de sódio.

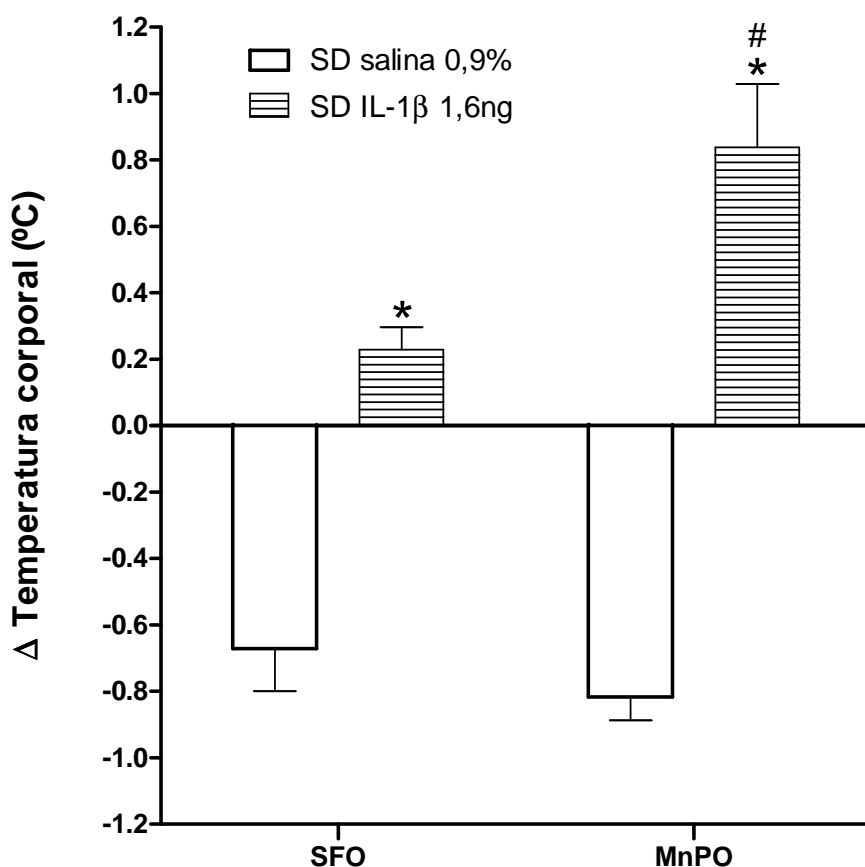
Animais que receberam IL-1 $\beta$  na dose 1,6 ng/rato foram comparados com animais tratados com salina 0,9%. ANOVA *two way* mostrou significativo efeito da IL-1 $\beta$  sobre a temperatura corporal [ $F_{(1,96)} = 199,82$ ;  $p < 0,0001$ ]. Com 5 minutos da administração da droga foi possível observar o aumento da temperatura corporal dos animais e esta hipertermia perdurou até o final do experimento. A temperatura corporal do grupo controle, no curso do experimento, retornou aos valores basais, isto é, antes do tratamento.



**Figura 7.** Mudanças na temperatura corporal de ratos após microinjeções de IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng/rato ou salina 0,9% no SFO. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O (\*) indica diferença estatística significativa do grupo tratado com IL-1 $\beta$  comparado ao grupo controle depletado de sódio (DS). (ANOVA *two way* seguida do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ ).

### Comparação do efeito hipertermico da IL1 $\beta$ injetada no SFO e no MnPO.

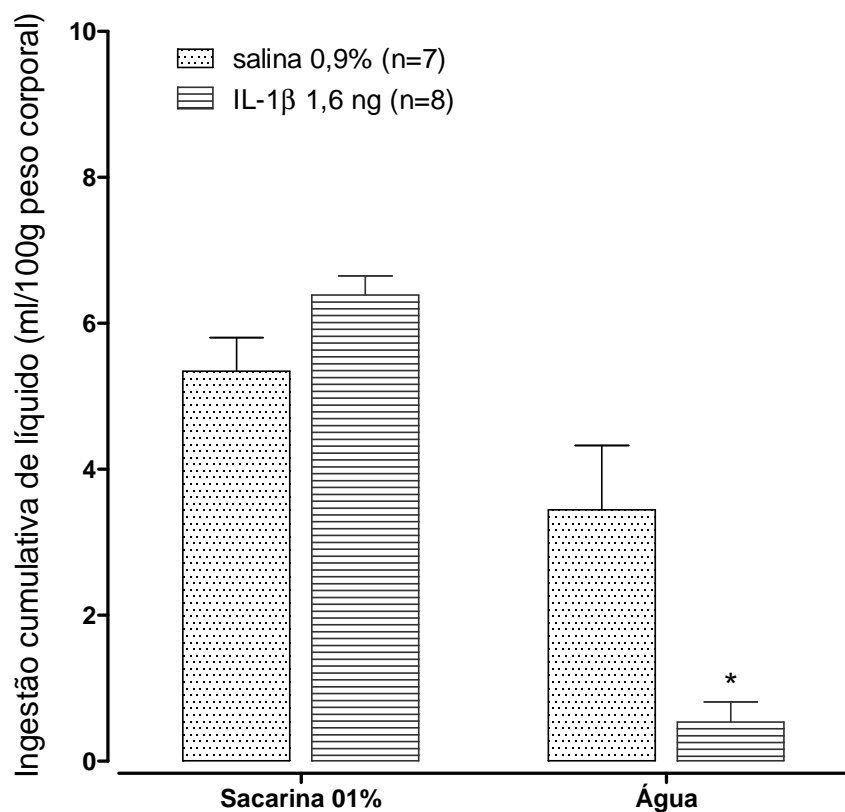
O aumento da temperatura corporal que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  na dose 1,6 ng/rato no SFO foi comparado com o aumento da temperatura do grupo que recebeu o mesmo tratamento no MnPO. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo que recebeu IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng no SFO quando comparados com o grupo que recebeu o mesmo tratamento no MnPO sendo a resposta nesta área mais intensa. A análise dos dados foi realizada por meio da ANOVA *one way* [F(3,26) = 39,38; P<0,0001].



**Figura 8.** Comparação do aumento da temperatura corporal induzido pela injeção de IL- $\beta$  no SFO e na MnPO (120 minutos). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre as áreas SFO e MnPO tratadas com IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng. (#) indica diferença dos grupos tratados com IL- $\beta$  com os grupos tratados com salina 0,9% controle (depletado de sódio). Os dados foram tratados com ANOVA *one way* seguida do pós-teste de Student- Newman-Keuls; p< 0,05.

**Teste de sobremesa em animais privados de água por 24 horas que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  ou salina 0,9% no MnPO.**

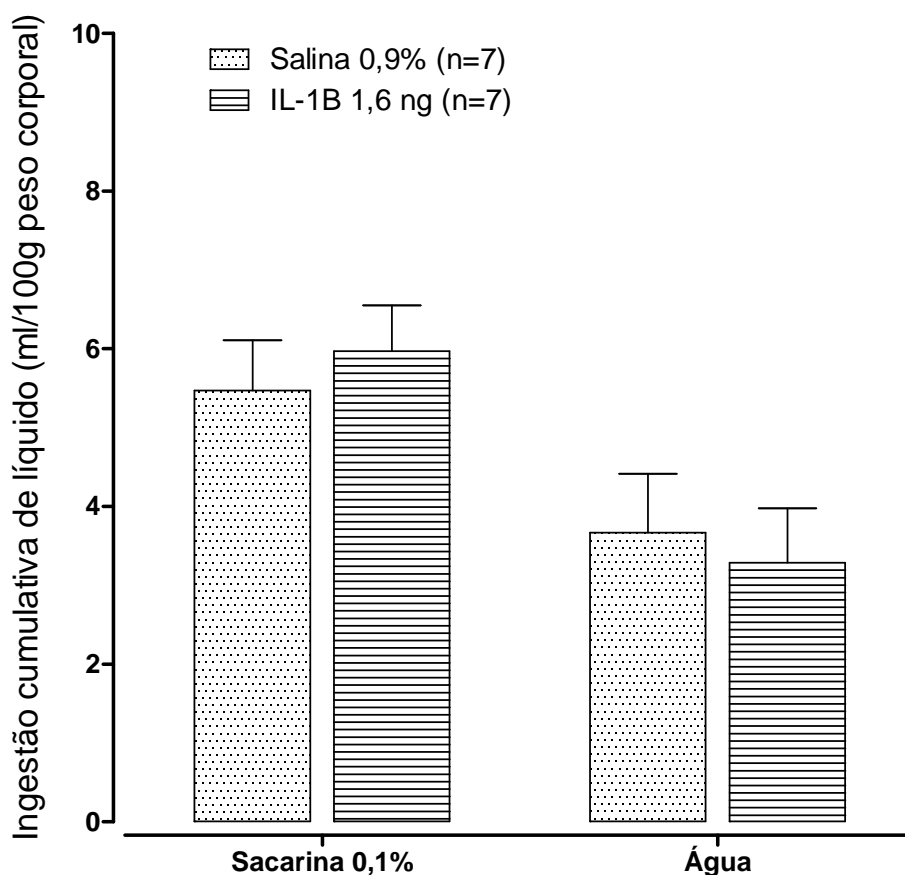
A ingestão preferencial de uma solução saborosa caracteriza o comportamento hedônico proposto pelo teste de sobremesa. Este comportamento não foi alterado pela IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng/rato ( $6,38 \pm 0,26$  ml/100g de peso corporal) quando comparado aos animais controles ( $5,34 \pm 0,45$  ml/100g de peso corporal), [t= 2,045; gL=13, p =0.0617]. Animais tratados com IL-1 $\beta$  apresentaram redução na ingestão de água ( $0,67 \pm 0,29$  ml/100g de peso corporal) quando comparados com animais do grupo controle ( $3,44 \pm 0,88$  ml/100g de peso corporal); [t= 3,135; gL=13 p =0,0079].



**Figura 9.** Ingestão cumulativa de sacarina 0,1% e água filtrada após microinjeções de IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng ou salina 0,9% no MnPO. A ingestão de animais tratados com IL-1 $\beta$  foi comparada à ingestão do grupo controle. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O tratamento estatístico utilizado foi o teste t de Student não pareado ( $t < 0,05$ ). O (\*) indica diferença estatisticamente significativa do grupo tratado com IL-1 $\beta$  comparado ao grupo controle.

**Teste de sobremesa em animais privados de água por 24 horas que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  ou salina 0,9% no SFO.**

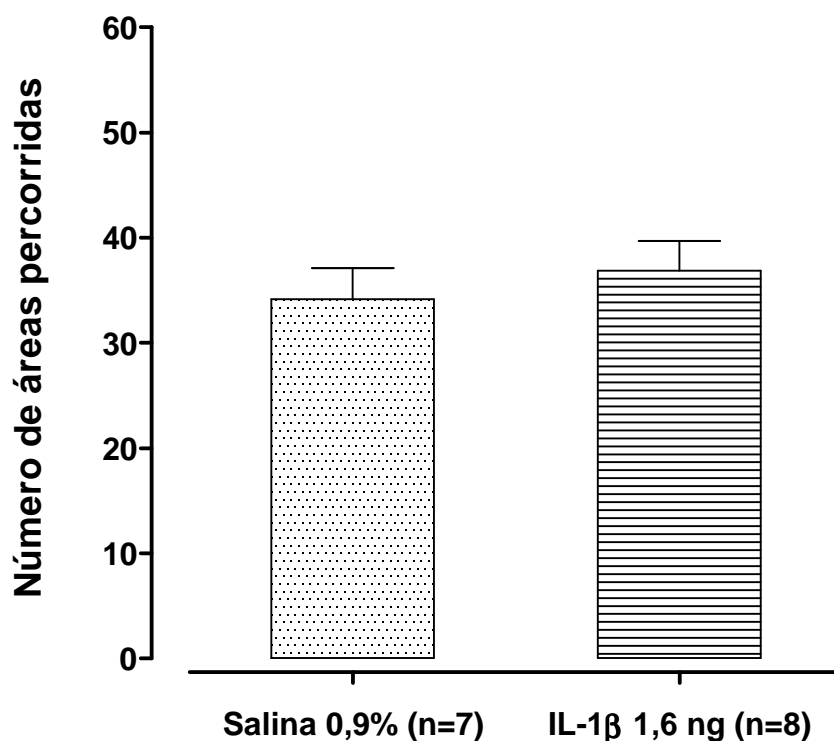
A IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng não modificou a preferência dos animais por sacarina 0,1% ( $5,9 \pm 0,58$  ml/100g de peso corporal) quando comparado com o grupo controle ( $5,4 \pm 0,63$  ml/100g de peso corporal); [t= 0, 5799; gL=12, p =0, 5727] e não houve diferença estatisticamente significativa na ingestão de água entre os grupos de animais [t = 0.3788 gL=12, p = 0,7144].



**Figura 10.** Ingestão cumulativa de sacarina 0,1% e água filtrada após microinjeções de IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng ou salina 0,9% no SFO. A ingestão de animais tratados com IL-1 $\beta$  foi comparada a ingestão do grupo controle. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O tratamento estatístico utilizado foi o teste t de Student não pareado (t < 0,05).

**Teste do campo aberto em animais depletados de sódio que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  ou salina 0,9% no MnPO.**

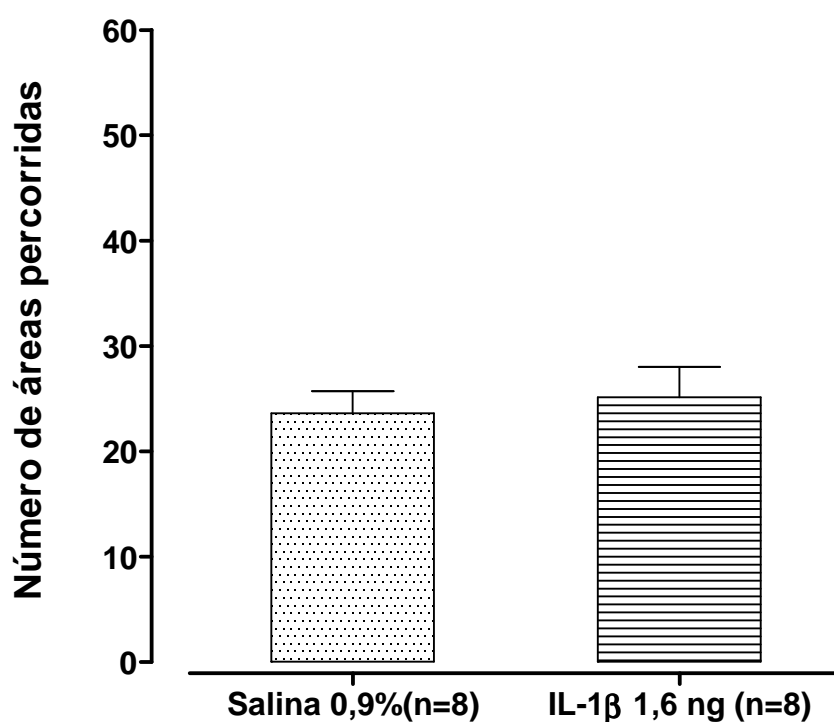
No teste de campo aberto não houve alterações significativas na atividade locomotora dos animais após tratamento com IL-1 $\beta$  na dose de 1,6ng/rato ( $36,8 \pm 2,83$ ) quando comparado aos animais controle ( $34,1 \pm 2,98$ );  $t = 0,6640$ ;  $gL=13$ ;  $p = 0,5183$ .



**Figura 11.** Número de áreas percorridas pelos animais no teste do campo aberto após microinjeções de IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng ou salina 0,9% no MnPO. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O tratamento estatístico utilizado foi o teste t de Student não pareado ( $t < 0,05$ ).

### Teste do campo aberto em animais depletados de sódio que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$ ou salina 0,9% no SFO.

Teste do campo aberto em animais depletados de sódio que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng/rato ou salina 0,9% no SFO mostra que não houve alterações significativas na atividade locomotora dos animais após tratamento com IL-1 $\beta$  ( $25,1 \pm 2,88$ ) ou salina 0,9% ( $23,6 \pm 2,08$ );  $t = 0,4216$  gL=14;  $p = 0,6797$



**Figura 12.** Número de áreas percorridas pelos animais no teste do campo aberto após microinjeções de IL-1 $\beta$  ou salina 0,9% no SFO. Não houve diferença estatisticamente entre os tratamentos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O tratamento estatístico utilizado foi o teste t de Student não pareado ( $t < 0,05$ ).

## VIII. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que a microinjeção de IL-1 $\beta$  no MnPO e SFO promove significativa inibição do apetite por sódio em ratos depletados deste íon, evidenciando o papel modulatório da IL-1 $\beta$  sobre a homeostasia hidrossalina nestas áreas. No MnPO a inibição se deu de forma dose dependente, sendo que na maior dose de IL-1 $\beta$  o apetite por sódio foi praticamente abolido, enquanto no SFO todas as doses inibiram a ingestão de salina hipertônica de forma semelhante e com a mesma eficiência. A inibição do apetite por sódio não parece ser decorrente de um mal estar generalizado (“*sickness behavior*”) ou de impossibilidade locomotora, desde que, nos testes de sobremesa e campo aberto, a IL-1 $\beta$  não modificou estes comportamentos. Este estudo confirma o efeito hipertérmico da IL-1 $\beta$  e mostra que o MnPO é mais sensível do que o SFO nesta resposta.

Mecanismos centrais excitatórios e inibitórios regulam o apetite por sódio e a ingestão de água (Johnson, 2007). Os mecanismos excitatórios para ingestão de sódio são ativados principalmente pela AII e mineralocorticóides e para a ingestão de água pela AII e hiperosmolaridade (Daniels & Fluharty, 2004). Protocolos foram criados para induzir o apetite por sódio experimentalmente e estão fundamentados nas variações homeostáticas de água e de sódio nos compartimentos intracelular e extracelular, que resultam em alterações na tonicidade (hiponatremia/hipernatremia) e volume (hipovolêmica/hipervolemia) dos líquidos. Muitos estudos utilizam a deficiência orgânica de sódio enquanto outros utilizam uma ou mais condições hormonais associadas à deficiência de sódio, tais como, elevadas concentrações de AII e/ou mineralocorticóides (Rowland, 2007). A utilização de diuréticos nos experimentos é prática recorrente para promover depleção deste íon no líquido extracelular. Estes fármacos associados à dieta hipossódica tem como resultado diurese expressiva e hiponatremia que induzem a sede e estimulam o apetite por sódio (Rowland, 2007) e resultam na ativação simpática e em respostas endócrinas na tentativa de manter a homeostasia. A furosemida é um diurético de alça que atua sobre o co-transportador de Na<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>/K<sup>+</sup> localizados na membrana luminal das células epiteliais, do ramo ascendente espesso da alça de Henle. O bloqueio deste co-transporte produz significativa excreção pela urina de água, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>. Neste estudo, utilizou-se furosemida com objetivo de induzir depleção deste de sódio e induzir o apetite por este íon. A depleção de sódio, por sua vez, ativa mecanismos que promovem a conservação de sódio pelos rins, reduzindo a perda renal deste íon e ativa mecanismos que desencadeiam o apetite por sódio como o sistema renina-angiotensina-

aldosterona (Chiaraviglio, 1975; Fitzsimons, 1998, Kloet et al, 2010).O aumento da angiotensina I na periferia pode ser percebido pelos órgãos circunventriculares e estimular a síntese de AII central, além disso, SNC apresenta todos os elementos do sistema angiotensinérgico (McKinley et al 2001). O SFO e o MnPO são áreas ricas em receptores angiotensinérgicos AT<sub>1</sub>, sensíveis tanto a AII periférica e central(Fitzsimons, 1998, McKinley et al 2001, Johnson, 2007). A AII e ALDO são potentes indutores do apetite por sódio (Fitzsimons, 1998; Geerling & Loewy, 2008).O tratamento com injeções subcutâneas de furosemida promove aumento na expressão de c-Fos em várias áreas centrais envolvidas na regulação do apetite por sódio, dentre elas SFO e A3V3 (Rowland et al, 1996).Estudo mostra que administração i.c.v de IL-1 $\beta$  promove significativo aumento na pressão arterial média e o pré-tratamento com antagonista AT<sub>1</sub> losartan aboliu a resposta pressora da IL-1 $\beta$ , este estudo fornece evidências que IL-1 $\beta$  pode agir em áreas circunventriculares, como SFO e A3V3, aumentando a sensibilidade da AII (Ufnal et al, 2006).

Vários mecanismos fisiológicos são necessários para manter a homeostasia hidrossalina. Alterações no equilíbrio entre água e eletrólitos são corrigidas através de mudanças autonômicas, endócrinas e comportamentais dirigidas pelo SNC (Antunes-Rodrigues et al; 2004; Patel, 2009). Diferentes neuropeptídios, neurotransmissores e receptores são ativados diante da necessidade de restauração de água e eletrólitos e disparam atividades motoras relacionadas à aquisição destes elementos (Johnson & Thunhorst, 1997; Stricker & Sved, 2000). O MnPO e SFO são áreas centrais altamente envolvidas na regulação central da homeostasia hidrossalina e junto com o OVLT compõem a lâmina terminal. Variações na omolaridade/natremia e hormônios circulantes como AII, peptídeo natriurético atrial e relaxina são percebidos pela população neuronal destas áreas (Fitzsimons, 1998, McKinley et al, 1999). O MnPO, SFO e OVLT apresentam conexões intensas e recíprocas o que permite a atuação destas estruturas como unidade funcional integrada que utilizam aminas e peptídeos como neurotransmissores (McKinley et al, 1999). Circuitos neurais envolvidos no controle da sede também estão envolvidos no controle do apetite por sódio, de modo que quando estimulam ou inibem a sede podem estimular ou inibir o apetite por sódio, contudo existem circuitos neurais que podem estimular a ingestão de água sem modificar a busca e a aquisição por sal (Johnson & Thunhorst, 1997; Stricker & Sved, 2000).

No presente estudo verificamos que a IL-1 $\beta$  tanto no MnPO quanto no SFO podem modificar o apetite por sódio em condições que mimetizam respostas inflamatórias. A deficiência homeostática de sódio dirige o animal a buscar alimentos e líquidos que contenha



este nutriente. O apetite por sódio não está relacionado às necessidades normais de ingestão deste íon e é consequência direta de um déficit orgânico condicionado a necessidade de restauração do fluido extracelular, assim o apetite por sódio é um mecanismo regulatório. A neurobiologia do apetite por sódio é similar a muitos sistemas sensores e não está restrito a um único órgão sensorio ou um único receptor. Para produzir um estado neural associado com o apetite por sódio o cérebro recebe constantes informações, de múltiplas fontes, relacionadas às condições dos líquidos corporais (Johnson, 2007).

A comunicação recíproca entre o SNC, sistema endócrino e o sistema imune existe e as citocinas são mediadores clássicos desta comunicação. (Watkins et al, 1999), respostas imunológicas no SNC compartilham sinais moleculares, como a IL-1 $\beta$ , e receptores comuns a estes sistemas (Licinio & Wong, 1996; Galea et al, 2006). A IL-1 $\beta$ , além de influenciar o sistema imune, pode modular diversas funções homeostáticas controladas pelo sistema nervoso central, incluindo a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, termorregulação, pressão arterial e comportamento ingestivo (Turnbull & Rivier, 1999; Ashdown et al, 2006; Ufnal et al, 2006; Kerádi et al, 2005). As principais células sintetizadoras de IL-1 $\beta$  são os monócitos sanguíneos, macrófagos teciduais e células dendríticas (Galea et al, 2006 ). Astrócitos e células da glia expressam, liberam e respondem aos mediadores da resposta imunológica como a IL-1 $\beta$ , além disso, os integrantes da família IL-1 são expressos de forma ampla no SNC e células endoteliais da barreira hematoencefálica podem liberar IL-1 $\beta$  (Banks, 2001, Allan et al, 2005). A IL-1 $\beta$  periférica pode acessar o SNC por sinalização via nervos periféricos, via segundos mensageiros ativados por células endoteliais em vasos cerebrais ou acessar diretamente o parênquima cerebral, seja por quebra temporária da barreira hematoencefálica, semelhante ao que ocorre em processos infecciosos, ou acessar áreas fora desta barreira. Estudos mostram que a IL-1 $\beta$  pode atravessar a barreira hematoencefálica por transportadores específicos e acessar o parênquima cerebral (Allan & Rothwell, 2003; Rothwell & Luheshi, 2000; Banks, 2001; Skinner et al, 2009, Threlkeld et al, 2010).

A administração tanto periférica quanto central de IL-1 $\beta$ , ou de LPS induz adiminuição da ingestão de água (Osaka et al, 1992, Plata-Salaman & French-Mullen, 1992, Cross-Mellor et al, 2000). No presente estudo testamos a hipótese de que áreas centrais banhadas pela IL-1 $\beta$ , após injeções no terceiro ventrículo, a exemplo do SFO, possivelmente estão envolvidas na modulação pela IL-1 $\beta$  sobre a homeostasia hidrossalina e assim, foi possível constatar que a IL-1 $\beta$  em áreas cerebrais específicas como o MnPO e SFO diminui a ingestão de sal. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a IL-1 $\beta$  promove um efeito

antinatrioréxico mais intenso no MnPO quando comparados ao mesmo efeito observado no SFO. A maior dose (1,6 ng/rato)aboliu o apetite por sódio enquanto a administração da mesma dose no SFO reduziu parcialmente a ingestão de salina hipertônica após a depleção de sódio, diante disto, especulamos que a ativação dos receptores para IL-1 $\beta$  presentes nas áreas estudadas, tenha promovido a inibição do apetite por sódio observada, como também especulamos que a maior sensibilidade do MnPO a IL-1 $\beta$ , quando comparada ao SFO, esteja possivelmente relacionada a quantidade de receptores para esta citocina expressos nesta área, entretanto no nosso estudo não utilizamos ferramentas que nos permita afirmar se a IL-1 $\beta$  atuou como neuromodulador, ativando diretamente seus receptores..

Estudos anteriores do laboratório de Neurociências mostraram respostas semelhantes às encontradas neste estudo, onde a injeção i.c.v de IL-1 $\beta$  promove significativa inibição da ingestão de água em três distintos protocolos indutores da sede: privação hídrica, hipernatremia associada à hiperosmolaridade e hipovolemia, e inibe a ingestão de sal em animais depletados de sódio. Em todos estes protocolos experimentais os efeitos antidipsogênico e antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$  parecem depender de um componente opioide central, uma vez que o pré-tratamento com naloxona, um antagonista opioide não seletivo, impede estes efeitos da IL-1 $\beta$ . (Luz et al, 2006; De Castro e Silva et al, 2006). Em outro estudo do laboratório, o efeito antidipsogênico da IL-1 $\beta$  foi mostrado depender dos receptores kapa opioides centrais (Luz et al, 2009).

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram interação entre o sistema imune e opioides (Bidlack, 2000). Culturas de leucócitos tanto em presença de LPS quanto de  $\beta$ -endorfina ou DADLE, agonistas delta opioide, promoveram a síntese de IL-1 $\beta$  e a produção desta citocina não foi inibida com o tratamento dos antagonistas delta opioide naloxona ou naltrindole (Gein et al, 2009), em outro estudo,timócitos incubados com IL-1 *in vitro* apresentam aumento da proliferação e de sítios ligantes para morfina, indicando possível participação de citocinas na indução de sítios de ligação de opioides em células imunes (Roy et al, 1991).Culturas de astrócitos hipotalâmicos após tratamento com IL-1 $\beta$  aumentam a expressão de receptores opioides mu, delta e kapa, o que possivelmenteindica interação entre os sistemas imune e opioide (Ruzicka & Akil, 1997). Estudo mostra que injeção periférica de IL-1 $\beta$  aumenta a expressão de RNAm de receptores kapa opioides nos gânglios da raiz dorsal e o tratamento com o IL-1RA bloqueia o aumento na expressão de RNAm para receptores kapa (Puehler, et al, 2006), emoutro estudo, injeção periférica ou central de IL-1 $\beta$  promove aumento da expressão de c-Fos em áreas cerebrais comoo NTS, PVN, AP, BST e CeA; neste mesmo

estudo, o pré-tratamento, periférico e central, com o antagonista naloxona, promove diminuição da expressão de c-Fos no NTS, PVN e AP e aumento no BST e CEA (Buller et al, 2005). Em estudo recente do laboratório de Neurociências, injeções i.c.v de Norbinaltorfimina (Nor-BNI) inibiu o apetite por sódio em animais depletados deste íon, mesmo quando os animais foram pré-tratados com AII, o que sugere participação de opioides na regulação central da homeostasia hidrossalina (Nascimento, AI et al, 2012). Diante destas informações, uma possível interação entre mediadores imunes, como a IL-1 $\beta$ , e opioides neste estudo não é descartada, contudo maiores investigações são necessárias, uma vez que apenas a IL-1 $\beta$  foi administrada nos cérebros dos animais.

Estudos mostram a participação da IL-1 $\beta$  na neurotransmissão central, dentre os efeitos mais estudados a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a liberação de monoaminas como a serotonina, dopamina e noradrenalina (Dunn, 2006). Injeção de IL-1 $\beta$  induz a liberação de serotonina, dopamina e noradrenalina (Shintanni et al, 1993) e tanto a administração periférica ou central induz a liberação de noradrenalina, serotonina e seus metabólitos (Dunn, 2006). Muitos estudos mostram a modulação serotoninérgica, dopaminérgica e colinérgica sobre a regulação central da homeostasia hidrossalina (Castro et al, 2002, D'Aquila et al, 2012; De Luca Jr & Menani). Assim sendo, a possibilidade da IL-1 $\beta$  estimular a liberação de um destes neurotransmissores no presente estudo não é descartada, contudo não podemos afirmar sobre isto, pois não foi realizado nenhum protocolo experimental que permitisse estudar os efeitos das microinjeções de IL-1 $\beta$  sobre a neurotransmissão central.

A IL-1 $\beta$  tanto central quanto periférica está envolvida na indução da febre durante processos inflamatórios e há evidências de que a febre induzida por injeção periférica de LPS seja modulada por IL-1 $\beta$  (Dinarello, 1996). Injeção periférica da citocina interleucina-10 (IL-10) parece modular a febre induzida por LPS por supressão da síntese de IL-1 $\beta$  e injeção central de IL-10 atenua a febre induzida por LPS e diminui a produção de IL-1 $\beta$  no hipotálamo, mas não no plasma e em tecidos periféricos (Ledebor et al, 2002). A interleucina-6 (IL-6), IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são as principais citocinas pirogênicas endógenas e IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  os principais indutores da síntese de IL-6 (Zetterström et al, 1998). Estudos mostram que a administração periférica e central de IL-1 $\beta$  ou LPS não induziu febre em animais “*Knockout*” de IL-6 (IL-6 $^{-/-}$ ) e o antagonista endógeno da IL-1, a IL-1RA, atenuou a febre induzida por LPS e IL-6, além disso, os níveis de IL-6 são diminuídos após tratamento com antagonista IL-1RA (Chai et al, 1996; Leon, 2004; Ashdown et al 2006; Luheshi et al,

1997). Outro estudo mostra que a febre induzida por de IL-6 sobre neurônios termorreguladores da área hipotalâmica anterior é modulada por prostaglandinas E2 (Nilsberth et al, 2009). Microinjeções de IL-1 $\beta$  na região ventromedial do globo pálido, no córtex orbitofrontal e NAc de ratos promovem significativo aumento na temperatura corporal e esta hipertermia foi mais expressiva que a promovida por injeções periféricas de IL-1 $\beta$  (Káradi et al, 2005; Lukáts et al, 2005; Takács et al, 2010).

A citoarquitetura dos órgãos circunventriculares pode permitir a ação de pirógenos circulantes durante a inflamação e a área pré-óptica (POA) e o hipotálamo anterior são consideradas áreas primárias para ações de pirógenos e antipiréticos (Nakashima et al, 1989, Stitt, 1990). A febre induzida por injeção periférica de IL-1 $\beta$  foi atenuada após injeções no terceiro ventrículo do antagonista IL-1RA e microinjeções deste antagonista no hipotálamo anterior, PVN e SFO também foi eficiente na atenuação da febre induzida por injeções sistêmicas de LPS. Estudo eletrofisiológico mostra que neurônios do SFO são despolarizados em resposta a IL-1 $\beta$  e isto é devido à ação desta citocina ao receptor IL-1. Assim, estes resultados parecem indicar especificidade da ação IL-1 $\beta$  em áreas centrais (Cartmell et al, 1999; Denson & Ferguson, 2003). Dados da literatura mostraram que culturas de neurônios termossensíveis da área pré-óptica foram responsivos a infusões de IL-1 $\beta$  mesmo em soluções livres de Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup>, ainda neste estudo, o tratamento com naloxona não altera a sensibilidade dos neurônios a IL-1 $\beta$ , baseados nestes achados, estes pesquisadores sugerem que a IL-1 $\beta$  pode agir sobre os neurônios na POA e induzir febre, sua ação é possivelmente pós-sináptica e esta resposta não depende do sistema opioide central (Nakashima et al, 1989). Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a atividade pirogênica da IL-1 $\beta$  descrita na literatura, possivelmente pela ativação dos receptores IL-1 presentes no MnPO e/ou SFO e permitem sugerir que a atividade desta citocina no MnPO é mais específica na indução de hipertermia que o SFO uma vez que o aumento da temperatura corporal nos animais que receberam IL-1 $\beta$  nesta área foi mais intenso.

O MnPO é indicado como importante área no controle central da temperatura corporal. (Morrison et al, 1998). Estudos mostram o envolvimento de projeções glutamatérgicas do LPBN na transmissão de sinais de receptores cutâneos de frio e de calor para o MnPO (Claphan, 2011). Observa-se também que vias gabaérgicas do MnPO ativadas por receptores cutâneos parecem ser um mecanismo de termorregulação importante na defesa frente a diminuição da temperatura ambiental e o aumento ou diminuição da temperatura

corporal é seguida de variações na expressão de c-Fos no MnPO (Nakamura, 2011; Morrison et al, 1998).

Estudos apontam a ativação de citocinas centrais, como a IL-1 $\beta$ , em resposta a ativação periférica do sistema imunológico por agentes infecciosos que promovem *sickness behavior* (Sherry et al, 2010). Surgiram evidências na direção do reconhecimento pelo cérebro de citocinas como sinais moleculares das doenças. A IL-1 $\beta$  pode acessar o SNC via aferências neuronais primárias que inervam o local da inflamação e se difundir para estruturas centrais que expressem receptores IL-1 (Parnet et al, 2002). Após injeções periféricas de LPS, camundongos resistentes a LPS não apresentam características relacionadas ao *sickness behavior* como a incapacidade de interação social, de ganho de peso e nenhum aumento nos níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$  (Segreti et al, 1996), este resultado sugere que a IL-1 $\beta$  participa dos eventos do *sickness behavior* como também da regulação dos efeitos comportamentais do LPS.

Estudos mostram que a IL-1 $\beta$  promove mudanças comportamentais que tendem a reduzir o gasto energético, diminuir a atividade locomotora e conseqüentemente reduzir a atividade exploratória, interação social e a busca e ingestão de alimentos e água (McCarthy et al, 1985, Johnson, RW, 1998; Kelley et al, 2002; Kongsman et al, 2008), estas respostas são importantes para a sobrevivência após infecções por diminuir o gasto energético. A inibição do apetite por sódio, observada neste estudo após injeção de IL-1 $\beta$  na dose de 1,6 ng/rato, não parece ter relação com a diminuição da atividade exploratória e motora dos animais ou um mal estar generalizado, uma vez que o teste do campo aberto não revelou nenhuma alteração nesta atividade, de modo a impossibilitar os animais a buscarem os bebedouros. Para investigar se a IL-1 $\beta$  foi eficiente em modificar a ingestão de salina hipertônica ou água através de uma inibição geral e inespecífica do SNC foi realizado o teste de sobremesa e, neste teste, não houve diferença na ingestão de sacarina 0,1% entre os animais que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  no MnPO ou SFO quando comparados com os animais que receberam salina 0,9%. Assim, a inibição do apetite por sódio, promovida pela IL-1 $\beta$ , foi específica para este comportamento e não prejudicou a expressão do comportamento hedônico uma vez que a ingestão de solução altamente palatável como a sacarina foi preservada.

Em resumo, os dados obtidos com este estudo sugerem que a IL-1 $\beta$  inibe o apetite por sódio em animais depletados deste íon. Especulamos que a ativação dos receptores IL-1 presentes no MnPO e SFO promovem efeito antinatriorexigênico, sendo o MnPO mais

sensível para esta resposta; a inibição do apetite por sódio observada neste estudo é específica para este comportamento e não está associada a uma deficiência locomotora ou mal estar generalizado. Este estudo confirma a atividade da IL-1 $\beta$  em áreas centrais específicas, possivelmente por ativação dos receptores IL-1 presentes no MnPO e SFO.

## IX. REFERÊNCIAS

1. ALLAN SM, ROTHWELL NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: p.734–744, 2001.
2. ALLAN SM, TYRRELL, PJ, ROTWELL, NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature review immunology*, 5:p.829-840, 2005.
3. ALLAN, SM, ROTHWELL, NJ. Inflammation in central nervous system injury .*Phil. Trans. R. Soc. Lond.B* 358, p.1669–1677, 2003.
4. AREND, WP, GUTHRIDGE, C. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist Isoforms. *J Ann Rheum* 59, p.60–i64, 2000.
5. BANKS, WA. Anorectic Effects of Circulating Cytokines: Role of the Vascular Blood–Brain Barrier. *Nutrition* 17:p. 434–437, 2001.
6. BIANCHETTI, MG, SIMONETTI, GD, BETTINELLI, A. Body fluids and salt metabolism- Part I. *Italian Journal of Pediatrics*, 35:p. 1-6, 2009.
7. BIDLACK JM, Detection and Function of Opioid Receptors on Cells from the Immune System. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 7 (5): p. 719–723, 2000.
8. BOUGHTER JR, JD, BACHMANOV AA. Behavioral genetics and taste. *BMC Neuroscience* 2007, S38:(Suppl 3), 2007.
9. BUCINSKAITE, V, KUROSAWAB, M, MIYASAKAC, K, F, AKIHIRO, LUNDEBERG, T. Interleukin-1b sensitizes the response of the gastric vagal afferent to cholecystokinin in rat. *Neuroscience Letters*, 229, p. 33–36, 1997.
10. BUDZIKOWSKI, AD, VAHID-ANSARI, F, LEENEN, FHH. Chronic activation of brain areas by high-sodium diet in Dahl salt-sensitive rats. *Am j Physiol Heart Cir Physiol*, 274: p. 2046-2052, 1998.
11. BULLER KM, HAMLIN AS, OSBORNE PB. Dissection of peripheral and central endogenous opioid modulation of systemic interleukin-1beta responses using c-Fos expression in the rat brain.*Neuropharmacology.* 49 (2): p. 230-242, 2005.
12. BYKOWSKI, MR, SMITH, JC, STRICKER, EM. Regulation of NaCl solution intake and gastric emptying in adrenalectomized rats. *Physiology & Behavior*, 92: p.781-789, 2007.

13. CARTMELL, T, LUHESHI G. N, ROTHWELL N. J. Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. *Journal of Physiology* 2: p.518-585, 1999.
14. CASTRO L, ATHANAZIO R, BARBETTA M, RAMOS AC, ANGELO AL, CAMPOS I, VARJÃO B, FERREIRA H, FREGONEZE J, CASTRO E SILVA, E. Central 5-HT<sub>2B/2C</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptor stimulation decreases salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Research*, 981: p. 151-159, 2003
15. CHIARAVIGLIO, E. Effect of renin-angiotensin system on sodium intake, *J. Physiol.*, 255, p. 57-66, 1975.
16. CLAPHAM JC. Central control of thermogenesis. *Neuropharmacology*. XXX: p.1-13, 2011.
17. CREWS EC. ROWLAND NE. Role of angiotensin in body fluid homeostasis of mice: effect of losartan on water and NaCl intakes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: p. 638-644, 2005.
18. CROSS-MELLOR SK, KENT WD, KAVALIERS M, OSSENKOPP KP. Examining the effects of lipopolysaccharide and cholecystokinin on water ingestion: comparing intake and palatability. *Brain Research*, 861: p.220-232, 2000.
19. DANIELS, D & FLUHARTY, SJ. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. *Physiology & Behavior*. 81. p. 319-337. 2004.
20. DANTZER R, KELLEY KW. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav. Immun.*, 21: p. 153–160, 2007.
21. DANTZER, R, O'CONNOR, JC, Freund, GG. Johnson, RW, Kelley, KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 9(1): p. 46–56, 2008.
22. D'AQUILA PS, ROSSI R, RIZZI A, GALISTU A. Possible role of dopamine D1-like and D2-like receptors in behavioural activation and contingent reward evaluation in sodium-replete and sodium-depleted rats licking for NaCl solutions. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 101: P99-106, 2012.
23. DE CASTRO E SILVA E, LUZ PA, MAGRANI J, ANDRADE L, MIRANDA N, PEREIRA V, FREGONEZE JB. Role of the central opioid system in the inhibition of



- water and salt intake induced by central administration of IL-1 $\beta$  in rats *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83: p. 285–295, 2006.
24. DE LUCA JR LA, MENANI JV. Multifactorial control of water and saline intake: role of  $\alpha$ 2-adrenoceptors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: p. 497-502, 1997.
  25. DE LUCA JR, LA, DERDERIAN, DTBP, VENDRAMINI, CR, DAVID, RICHARD B, MENANI, JV. Water deprivation-induced sodium appetite. *Physiology & Behavior*, 100: p. 535-544, 2010.
  26. DENSSON, SE, FERGUSON, AV. Interleukin 1 $\beta$  modulates rat subfornical organ neurons as a result of activation of a non-selective cationic conductance. *J Physiol*, 550 (1): p. 113-122, 2003.
  27. DIANA A, VAN DAM AM, WINBLAD B, SCHULTZBERG M. Co-localization of interleukin-1 receptor type I and interleukin-1 receptor antagonist with vasopressin in magnocellular neurons of the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *Neurosci.* 89: p. 137–147, 1999.
  28. DIJK, GV, EVERS, SS, GUIDOTTI, S, THORTNTON, SN, SCHEURINK, AJW, NYAKAS, C. The lateral hypothalamus: A site for integration of nutrient and fluid balance. *Behavioural Brain research.* 221 (2): p. 481-488, 2011.
  29. DINARELLO, CA. A clinical perspective of IL-1b as the gatekeeper of inflammation *Eur. J. Immunol.*41: p. 1203–1217, 2011.
  30. DINARELLO, CA. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. *Blood*, 87(6): p. 2095-2147, 1996.
  31. DINARELLO, CA. IL-1: Discoveries, controversies and future directions. *Eur. J. Immunol.* 40: p. 595–653, 2010.
  32. DINARELLO, CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117: p. 3720-3732, 2011.
  33. DUNN AJ. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clinical Neuroscience Research*6: p. 52–68, 2006.
  34. DUNN, AJ, SWIERGIELA, AH, BEAUREPAIREC, R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *NEUROSCI. AND BIOBEH. REV.* 29: p. 891–909, 2005.

35. ENGELHARDT, B. Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res*, 314: p. 119–129, 2003.
36. GADEK-MICHALSKA,A, TADEUSZ,J, RACHWALSKA,P SPYRKA, J, BUGAJSKI,. Effect of prior stress on interleukin-1 $\beta$  and HPA axis responses to acute stress. *Pharmacological Reports*, 63: p. 1393-1403, 2011.
37. GALEA I, BECHMANN I, PERRY V H. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol*. 28: p. 12–18, 2007.
38. GAUTRON, L, LAYÉ, S. Neurobiology of inflammation-associated anorexia. *Frontiers in neuroscience*, 3: p. 1-10, 2010.
39. GEERLIN, JC, ENGELAND, W C, KAWATA, M, LOEWY, AD. Aldosterone Target Neurons in the Nucleus Tractus Solitarius Drive Sodium Appetite .*The Journal of Neuroscience*, 26(2): p.411– 417, 2006.
40. GEERLING, JC, LOEWY AD. Central regulation of sodium appetite. *Exp Physiol*, 93: p.178–209, 2008.
41. GEIN SV, GORSHOVA KG, TENDRYAKOWA SP. Regulation of Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-8 Production by Agonists of  $\mu$  and  $\delta$  opiate receptors in vitro. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 39 (6): p.591-595, 2009.
42. GOTO M, FUJISAWA M, YAMADA A, OKABE T, TAKAKU F, SASANOM, NISHIOKA K. Spontaneous release of angiotensin converting enzyme and interleukin 1 from peripheral blood monocytes from patients with rheumatoid arthritis under a serum free condition. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 49: p. 172-176, 1990.
43. GROB, M, MOUGINOT, D. Heterogeneous chloride homeostasis and GABA responses in the median preoptic nucleus of the rat. *J Physiol* 569(3) p. 885–901, 2005.
44. HELLERSTEIN , MK, MEYDANI, SN, MEYDANI M , WU , K, DINARELLO, CA. Interleukin-1-induced anorexia in the rat. Influence of prostaglandins. *J Clin Invest*, 84 (1): p.228- 235, 1989.
45. HENRY M, GROB M, MOUGINOT D. Endogenous angiotensin II facilitates GABAergic neurotransmission afferent to the Na<sup>+</sup>-responsive neurons of the rat median preoptic nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297: p.783–792, 2009.

46. HENRY, M, DROLET, M, MOUGINOT, D. Postsynaptic l-opioid receptor response in the median preoptic nucleus is altered by a systemic sodium challenge in rats. *European Journal of Neuroscience*, 27: p. 1197–1209, 2008.
47. HIYAMA TY, WATANABE E, OKADO H, NODA M. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na(x) sodium channels for the control of salt-intake behavior. *Journal neuroscience*, 24(42): p.9276-9281, 2004.
48. HOPKINS, SJ, ROTHWELL, NJ. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends in neuroscience*, 18: p.83-88, 1995.
49. JOHNSON AK, LOEWY AD. Circumventricular organs and their role in visceral functions. In: Loewy AD, Spyer KM, editors. *Central regulation of autonomic functions*. New York: Oxford University Press; 1990. p. 247-67.
50. JOHNSON, A.K., SCHWOB, J.E., Cephalic angiotensin receptors mediating drinking to systemic angiotensin II. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3: p.1077–1084. 1975.
51. JOHNSON, AK, GROSS, PM. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *The FASEB Journal*, 7: p. 678-686, 1993.
52. JOHNSON, AK, The sensory Psychobiology of Thirst and salt Appetite. *Med. Sci. Sports exerc.* 39: p. 1388-1400, 2007.
53. JOHNSON, AK., THUNHORST, RL. The Neuroendocrinology of Thirst and Salt Appetite: Visceral Sensory Signals and Mechanisms of Central Integration. *Frontiers in neuroendocrinology*, 18: p. 292–353, 1997.
54. JOHNSON, RW. Immune and endocrine regulation of food intake in sick animals. *Domestic animal endocrinology*. 15(5): p.309-319, 1998.
55. KAMIKAWA, H, HORI, T, NAKANE, H, AOU, S, NOBUTADA, T. IL-1 $\beta$  increases norepinephrine level in rat frontal cortex: involvement of prostanoids, NO, and glutamate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 275: p.803-810, 1998.
56. KANNAN, H, IKI, K, ISHIZUKA, Y, KATO, K, SHIMOKAWA, A, SAITA, M., KUNITAKE, T, HANAMORI, T. Effects of Systemic Interleukin-1 $\beta$ . Administration on Daily Drinking and Renal Excretory Function in Conscious Rats. *Physiology & Behavior*, 61(5): p. 707–715, 1997.
57. KARÁDI, Z, LUKÁTS, B, EGYED, R, 1, LÉNÁRD L. Homeostatic alterations after intrapallidal microinjection of interleukin-1 $\beta$  in the rat. *Appetite* 44: p. 171–180, 2005.

58. KELLEY, KW, BLUTHÉ, RM, DANTZER, R, ZHOW, WJ, JOHNSON RW, BROUSSARD, RS. Cytokine-induced sickness behavior. *Brain, Behavior and Immunity*, 17: p.112-118, 2003.
59. KENT, S, RODRIGUEZ JF, KELLEY KW, DANTZER, FR. Reduction in Food and Water Intake Induced by Microinjection of Intedeukin-1/3 in the Ventromedial Hypothalamus of the Rat *Physiology & Behavior*, 56(5): p. 1031-1036, 1994.
60. KONSMAN, JP, TRIDON, V, DANTZER, R. Diffusion and action of intracerebroventricularly injected interleukin-1 in the CNS. *Neuroscience*. 101(4), p. 957–967, 2000.
61. KRAUSE, EG, SAKAI, RR. Ricther and sodium appetite: From adrenalectomy to molecular biology. *Appetite* 49: p. 353-367, 2007.
62. KUROSAWA, M, UVNAS-MOBERG, K, MIYASAKA, K, LUNDEBERG, T. Interleukin-1 increases activity of the gastric vagal afferent nerve partly via stimulation of type A CCK receptor in anesthetized rats *Journal of the Autonomic Nervous System*, 62: p.72–78, 1997.
63. LANGHANS, W, HRUPKA, B. Interleukins and tumor necrosis factor as inhibitors of food intake. *Neuropeptides*, 33(5): p. 415- 424, 1999.
64. LEDEBOER, A, BINNEKADE, R, BREVÉ, JJP, BOL, JGJM. TILDERS, FJH, VAN DAM AM. Site-specific modulation of LPS-induced fever and interleukin-1  $\beta$  expression in rats by interleukin-10. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282: p.1762-1772, 2002.
65. LEE, HY, WHITESIDE, MB, HERKENNHAN, M. Area Postrema removal abolishes stimulatory effects of intravenous interleukin- 1 $\beta$  on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and c-Fos mRNA in hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research Bulletin*, 46(6): p. 495-503,1998.
66. LEON, Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines. *Frontiers in Bioscience*. 9: p.1877-1888, 2004.
67. LEWIS A, VARGHESE S, XUH, ALEXANDER R. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*, 4: 48, 2006.

68. LICINIO J, WONG M-L. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. *J. Clin Invest*; 28: p.23-5, 1997.
69. LINTHORST, A.C.E, FLASCHSKAMM, C, MULLER, P.P, HOLSBOER, F, JOHANNES MHM. Effect of bacterial Endotoxin and interleukin - 1 $\beta$  on Hippocampal Serotonergic Neurotransmission, Behavioral activity and free corticosterone levels: An in vivo Microdialysis Study. *The Journal Neuroscience*, 15(4): p. 2920-2934, 1995.
70. LUZ CP, SOUZA, A. REIS, R. MINEIRO P. FERREIRAC HS, FREGONEZE, JB. DE CASTRO E SILVA, E. The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: Role of 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Brain research*, 1139: p. 178-194, 2007.
71. LUZ PA, ANDRADE L, MIRANDA N, PEREIRA V, FREGONEZE J, De Castro e Silva E. Inhibition of water intake by the central administration of IL-1 $\beta$  in rats: Role of the central opioid system. *Neuropeptides* 40: p. 85-94, 2006.
72. LUZ PA, SARAIVA R, ALMEIDA T, FREGONEZE JB, DE CASTRO E SILVA E. Blockade of central kappa-opioid receptors inhibits the anti-dipsogenic effect of interleukin-1 $\beta$ . *Neuropeptides* 43: p. 93-103, 2009.
73. LUZ, C., SOUZA, A., REIS, R., FREGONEZE, J.B., DE CASTRO E SILVA, E., Role of 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Res.* 1099: p.121–132, 2006.
74. MAGRANI J, DE CASTRO E SILVA E, ATHANAZIO R, IMPROTA L, FREGONEZE JB. Involvement of central H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors in water intake induced by hyperosmolarity, hypovolemia and central cholinergic stimulation. *Physiol Behav.*30: p.241-9, 2006
75. MALYAK, M, GUTHRIDGE, J.M, HANCE, K.R, DOWER, S.K, FREED, W.P. Characterization of a Low Molecular Weight Isoform of IL-1 Receptor Antagonist. *J Immunol*, 161: p.1997-2003, 1998.
76. MALYAK, M, SMITH JR, M.F, ABEL AA, HANCE, K.R, W.P, AREND. The Differential Production of Three Forms of IL-1 Receptor Antagonist by Human Neutrophils and Monocytes. *J Immunol* 161: p.2004-2010, 1998.
77. MCCARTHY, D, KIUGER, M.J, VANDER, A.J. Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 42: p. 1179-1182, 1985.

78. MCKINLEY, MJ, MATHAI, ML, MCALLEN, RM, MVALLEN RC, MISELIS, RR, PENNINGTON, GL, VIVAS, L, WADE, JD, OLDFIELD, R. Vasopressin secretion: Osmotic and Hormonal regulation by lamina terminalis. *Journal of neuroendocrinology*, 16: p. 340-347, 2004.
79. MCKINLEY, MJ, ALBISTON, AL, ALLEN, AM, MATHAI, ML, MAY, CN, McALLEN, OLDFIELD, BJ, MENDELSON, FAO, CHAI, SY. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: p. 901-918, 2003.
80. MCKINLEY, MJ, BADOER, E, OLDFIELD, BJ. Intravenous angiotensin II induces Fos-immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. *Research*, 594: p.295-300, 1992.
81. MCKINLEY, MJ, CAIRNS, MJ, DENTON, DA, EGAN, G, MATHAI, ML, USCHAKOV, A, WADE, JD, WEISINGER, RS, OLDFIELD, BJ. Physiological and pathophysiological influences on thirst. *Physiology & Behavior* 81: p. 795– 803, 2004.
82. MCKINLEY, MJ, JOHNSON, AK. The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake. *News Physiol Sci* 19: p.1-6, 2004.
83. MCKINLEY, MJ, GERSTBERGER, RD, MATHA, ML, OLDFIELD, BJ, SCHMID, H. The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *Journal of Clinical Neuroscience* 6(4), p.289-301, 1999.
84. MONROY, MANUEL, KULUZ, JOHN W. HE DANSHA, DIETRICH, W. DALTON AND CHARLES L. SCHLEIEN. Role of nitric oxide in the cerebrovascular and thermoregulatory response to interleukin-1 $\beta$ . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: p.1448-1453, 2001.
85. MORRIS, MJ, NA, ES, JOHNSON. Salt craving: The psychobiology of pathogenic sodium intake. *Physiology & Behavior*, 94: p. 709-721, 2008.
86. MORRISON, SF, NAKAMURA, K MADDEN, CJ. Central control of thermogenesis in mammals. *EXP* 93(7): p.773–797., 2008.
87. NA, ES, MORRIS, MJ, JOHNSON, RF, BELTZ TG, JOHNSON, AK. The neural substrates of enhanced salt appetite after repeated sodium depletions. *Brain Research*, 1171: p.104-110, 2007.

88. NAKAMURA K, MORRISON SF. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* 11: p. 62–71, 2008.
89. NAKAMURA K, MORRISON SF. Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling *J. Physiol.* 586: p. 2611–2620, 2008.
90. NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: p.1207–1228, 2011.
91. NAKASHIMA, T, HORI, T, MORI, T, KURIYAMA, K, MIZUNO, K. Recombinant Human Interleukin- 1 p Alters the Activity of Preoptic Thermosensitive Neurons In Vitro. *Brain Research Bulletin*, 23, p. 209-213, 1989.
92. NASCIMENTO AI, FERREIRA HS, SARAIVA RM, ALMEIDA TS, FREGONEZE JB. Central kappa opioid receptors modulate salt appetite in rats. *Physiology Behavior.* 106(4):p 506-514, 2012.
93. NETEA, MG, SIMON, A, VAN DE VEERDONK, F, KULLBERG B-J, VAN DER MEER, JWM, JOOSTEN, LAB. IL -1b Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. *PLoS Pathog* 6(2): p. 1-9, 2010.
94. NODA, M. The Subfornical Organ, a Specialized Sodium Channel, and the Sensing of Sodium Levels in the Brain. *Neuroscientist* 12: p. 80 – 91, 2006.
95. OKADA K, YOSHIDA Y, SUGIURA T, TANAKA H, TSUJI S, YAMASHITA H, YAMASHITA U. Reduced interleukin-1 responsiveness in immune system and central nervous system of inbred polydipsic (str/n) mice. *Life Sciences*, 66: 1461-1470, 2000.
96. OPRICA, M, Zhu, S, Goiny, M, Pham, TM, MOHAMMED, AB, WINBLAD, B, BARTFAI, T, SCHULTZBERG, M. Transgenic overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in CNS influences behavior, serum corticosterone and brain monoamines. *Brain, Behavior and immunity*, 19: p.223-234, 2005.
97. OSAKA T, KANNAN H, KAWANO S, UETA Y, YAMASHITA H. Intraperitoneal administration of recombinant human interleukin-1b inhibits osmotic thirst in the rat. *Physiol. Behav.* 51: p. 1267–1270, 1992.
98. PARNET P, KELLEY KW, B, BLUTHE´ RM, DANTZER R. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain.Role in cytokines-induced sickness behavior . *Journal of Neuroimmunology*, 125: 5– 14, 2002.

99. PATEL, S. Sodium Balance an Integrated Physiological Model and Novel Approach. Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation. 20(4): p. 560-569. 2009.
- 100.PATRICIA P, KEITH W K, ROSE-MARIE B, ROBERT D. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior Journal of Neuroimmunology, 125: p. 5– 14, 2002.
- 101.PAXINOS, G & WATSON, C. The rat brain: in stereotaxic coordinates. 4rd ed. California: Academic Press, 1998.
- 102.PERRUZZO M, MILANI GP, GARZONI L, LONGONI, L, SIMONETTI, GD, BETTINELLI, A, FOSSALI, EF, BIANCHETTI MG. Uids and salt metabolismo – PartII. Italian Journal of pediatrics. 36: p. 78-86, 2010.
- 103.PINTEAUX, E, TROTTER , P, SIMI, A. Cell-specific and concentration-dependent actions of interleukin-1 in acute brain inflamation. Cytokine, 45: p. 1-7, 2009.
- 104.PLATA-SALAMAN CR, FFRENCH-MULLEN JMH. Intracerebroventricular administration of a specific IL-1 receptor antagonist blocks food and water intake suppression induced by interleukin-1b.Physiol. Behav. 51: p. 1277–1279, 1992.
105. PUEHLER W. RITTNER HL, MOUSA SA, BRACK A, KRAUSE H, STEIN C, SCHÄFER M. Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mrna in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation. Neuroscience,141: p. 989–998, 2006.
- 106.QUAN, NK, SUNDAR, WEISS, JM. Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. Journal of Neuroimmunology 49: p.125-134, 1994.
- 107.RAMAMOORTHY, S, RAMAMOORTHY JD, PRASAD, PD, BHAT, GK, MAHESH, VB, LEIBACH, FH, GANAPATHY, V. Regulation of the human serotonin transporter by interleukin-1 beta. Biochem Biophys Res Commun, 13,216(2): p. 560-567.
- 108.ROTHWELL NJ, HOPKINS SJ. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. Trens in Neuroosci. 18: p. 130-136, 1995.
- 109.ROTHWELL NJ, LUSHESHI GN. Interleukin-1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. Trends Neurosci 23(12): p.618-25.
- 110.ROTHWELL, NJ,LUHESHI , GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. 23(12): p.618-625, 2000.



111. ROWLAND NE, FREGLY MJ, HAN L, SMITH G. Expression of Fos in rat brain in relation to sodium appetite: furosemide and cerebroventricular renin. *Brain Research*, 728 (1): p. 90-96, 1996.
112. ROY S, Ge BL, RAMAKRISHNAN S, LEE NM, LOH HH. [<sup>3</sup>H] Morphine binding is enhanced by IL-1- stimulated thymocyte proliferation. *Federation of European Biochemical Societies*. 287 (1,2): p. 93-96
113. SAAD ,WA, GUARDA, IF, DE ARRUDA CAMARGO LA, DOS SANTOS TA, SAAD WA. L-type calcium channels mediate water intake induced by angiotensin injection into median preoptic nucleus. *Pharmacol Biochem Behav*. 83(4):p.598-602, 2006
114. SEWARDS, TV, SEWARDS, MA. The Awareness of Thirst: Proposed Neural Correlates. *Consciousness and Cognition*, 9: p.463–487, 2000.
115. SHINTANI, F, KANBA, S, NAKAKI, T, NIBUYA, M, KINOSHITA, N, SUZUKI, E, YAGI, G, KATE, R, ASAIL, M. Interleukin-1 $\beta$  augments release of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the rat anterior hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, 73(8): p. 3574-3581, 1993.
116. SK, CROSS-MELLOR, KENT, WDT, KAVALIERS, M, OSSENKOPP, KP. Examining the effects of lipopolysaccharide and cholecystokinin on water ingestion: comparing intake and palatability. *Brain Research*. 861: p. 220–232, 2000.
117. STELLAR, E. Salt appetite: its neuroendocrine basis. *Acta neurobiol Exp*. 53: p. 475-484, 1993.
118. STITT, JT. Passage of Immunomodulators Across the Blood-Brain Barrier *The Yale Journal of biology and Medicine*, 63: p. 121-131, 1990.
119. STRICKER, EM, HOFFMANN, ML. Control of thirst and salt appetite in rats: Early inhibition of water and Nacl ingestion. *Appetite*, 46: p. 234-237, 2006.
120. TAKÁCS, G, PAPP, S, LUKÁTS B, SZALAY, C, NAGY, B, FOTAKOS, D, KARÁDI Z Homeostatic alterations after IL-1 $\beta$  microinjection into the nucleus accumbens of the rat. *Appetite*, 54: 354-362, 2010.
121. TAKAHASHI, Y, SMITH, P, FERGUSON, A., PITTMAN, QJ. Circumventricular organs and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: p.1690-1695, 1997.

122. TANAKA J, HAYASHI Y, SHIMAMUNE S, MASAHIKO N. Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Brain Research*, 777: p. 237-241, 1997.
123. TANAKA, J, NOMURA, M, KARIYA, K, NISHIMURA, JI, KIMURA, F. Median Preoptic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus are sensitive to blood pressure changes.. *Brain research*, 605: p. 338-341, 1993.
124. THORNTON, SN et al.. Mineralocorticoid modulation of central angiotensin-induced neuronal activity, water intake and sodium appetite. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40: p. 699-705. 2007.
125. UFNAL M, DUDEK M, ZERA T, SZCZEPANSKA-SADOWSKA E. Centrally administered interleukin-1 beta sensitizes to the central pressor action of angiotensin II. *Brain Res*. 1100: p. 64–72, 2006.
126. VAN DER MEER, MJM, SWEEP, CG JF, PESMAN, GJ. Chronic stimulation of the hypothalamus\_pituitary\_adrenal axis in rats by interleukin -1  $\beta$ : central and peripheral mechanisms. *CYTOKINE*, 12(1): p. 910-919, 1996.
127. VERBALIS, JG. Disorders of body water homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 17(4): p. 471–503. 2003.
128. VITKOVIC, L, BOCKAERT, J, JAQUE, C. “Inflammatory” Cytokines: Neuromodulators in Normal Brain?. *Journal of Neurochemistry*. 74: p. 457-471, 2000.
129. VOORHIES, AC, BERNSTEIN, IL. Induction and expression of salt appetite: Effects on Fos expression in nucleus accumbens. *Behavioural Brain Research* 172: p. 90–96, 2006.
130. WATANABE, E, HIYAMA, TY, SHIMIZU, H, KODAMA, R, HAYASHI, N, MIYATA, S, YANAGAWA, Y, OBATA, K, NODA, M. Sodium-level-sensitive sodium channel  $Nax$  is expressed in glial laminae processes in the sensory circumventricular organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290: p. 568-576, 2006.
131. WATANABE, E, FUJIKAWA, A, MATUNAGA, H, YASOSHIMA, Y, SAKO, N, YAMAMOTO, T, SAEGUSA, NODA, M.  $Nav2/NaG$  Channel Is involved in control of salt- Intake Behavior in CNS. *The Journal of Neuroscience*, 15: p. 7743-7751, 2000.
132. WATKINS LR, HANSEN MK, NGUYEN KT, LEE JE, MAIER SF. Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1 $\beta$ : molecular biology for nonmolecularbiologists. *Life Sci*. 65: p. 449–481, 1999.

133. WATKINS, LR, HANSEN, MK, NGUYEN, KT, LEE, JE, MAIER, SF. Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1: molecular biology for non-molecular biologists. *Life Sciences*, 65(5): p. 449-481, 1999.
134. XU Z, JOHNSON AK. Central renin injections: effects on drinking and expression of immediate early genes. *Brain Research*, 26:p.24-35, 1998.
135. ZETTERSTROM MM, ANDERSON, AKS, OSTLUND, P, BARTFAI, T. Delineation of the Proinflammatory Cytokine Cascade in Fever Induction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Molecular mechanism of fever, 856: p. 48-52, 1998.