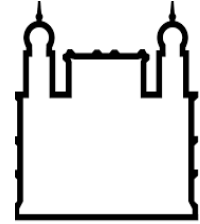




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

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

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO DOS EFEITOS DA INTERLEUCINA-1BETA NOS NÚCLEOS  
CENTRAL E MEDIAL DA AMÍGDALA SOBRE O APETITE POR  
SÓDIO E O PAPEL DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO CENTRAL**

**DIANA RODRIGUES DE CERQUEIRA**

**Salvador- Bahia**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**ESTUDO DOS EFEITOS DA INTERLEUCINA-1BETA NOS NÚCLEOS  
CENTRAL E MEDIAL DA AMÍGDALA SOBRE O APETITE POR  
SÓDIO E O PAPEL DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO CENTRAL**

**DIANA RODRIGUES DE CERQUEIRA**

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

Tese apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Patologia Humana,  
para obtenção do grau de Doutor.

Salvador- Bahia

2017

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Cerqueira, Diana Rodrigues.

C416e De estudo dos efeitos da interleucina-1beta nos núcleos central e medial da amígdala sobre o apetite por sódio e o papel do sistema serotoninérgico central/ Diana Rodrigues Cerqueira. - 2017.

123f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josmara Bartolomei Fregoneze, Laboratório de Neurociências - Instituto de Ciências da Saúde- Universidade Federal da Bahia..

Tese (Doutorado em Patologia) –Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

Interleucina-1 $\beta$ . 2. Apetite por Sódio. 3. Serotonina. 4. Hipertermia.

Título

CDU 611.81:615.241

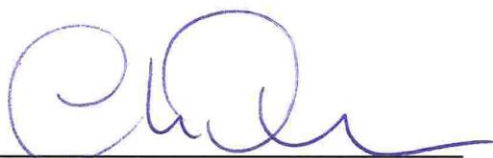
Título da Tese: " ESTUDO DOS EFEITOS DA INTERLEUCINA – 1BETA NOS NÚCLEOS CENTRAL E MEDIAL DA AMÍGDALA SOBRE O APETITE POR SÓDIO E O PAPEL DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO CENTRAL"

**DIANA RODRIGUES DE CERQUEIRA**

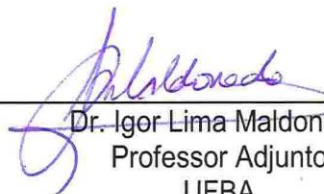
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 05 de junho de 2017

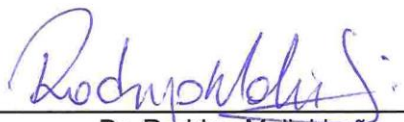
COMISSÃO EXAMINADORA



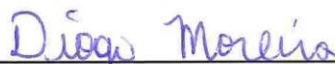
Dra. Camila Alexandrina de Figueiredo  
Professora Associada I  
UFBA



Dr. Igor Lima Maldonado  
Professor Adjunto  
UFBA



Dr. Rodrigo Molini Leão  
Professor Adjunto  
UFBA



Dr. Diogo Rodrigo de Magalhaes Moreira  
Professor  
IGM/Fiocruz



Dra. Josmara Bartolomei Fregoneze  
Professora Titular  
UFBA

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq.

**Ao grande amor da minha vida, minha avó Ricarda  
(*in memoriam*), toda gratidão, todo o afeto, toda alegria e  
todo o aprendizado da convivência terrena.**

**“Separadas pelo plano físico, mas ciente que os laços que nos  
unem são eternos”**

*Fôssemos nós como deveríamos ser  
E não haveria nós a necessidade da ilusão...  
Bastar-nos-ia sentir com clareza e vida  
E nem repararmos para que há sentidos...  
Mas graças a Deus que há imperfeições no Mundo  
Porque a imperfeição é uma coisa,  
E haver gente que erra é original,  
E haver gente doente torna o mundo engraçado.  
Se não houvesse imperfeição, haveria uma coisa a menos,  
E deve haver muita coisa  
Para termos muito que ver e ouvir...*

*Alberto Caeiro, in "O Guardador de Rebanhos- Poema XLI"  
Heterônimo de Fernando Pessoa.*

Se eu tivesse o dom da profecia, se conhecesse todos os mistérios da ciência, se tivesse toda a fé, a ponto de remover montanhas, mas não tivesse amor, eu nada seria.

1Cor, 13, 2.

## AGRADECIMENTOS

Ao Deus pai e mãe, mentor da minha vida, arquiteto do universo, misericórdia, amor e suprema caridade. Ao meu anjo guardião, amigo querido e fiel, aos seres de luz que me inspiram, animam e protegem na jornada da vida.

Aos meus pais, Márcia e Tino e ao meu irmão Diogo: obrigada por todo amor, amparo e compreensão nas lutas, dores e alegrias da vida. Obrigada pelas suas imperfeições acertivas e perfeições falhas, necessárias a minha formação como ser humano, que nortearam a formação do meu caráter. Obrigada por me aceitarem e amarem do jeito imperfeito perfectível, que sou. Amo e amarei vocês por toda eternidade! Grata pela oportunidade em tê-los como família terrena.”.

À professora Josmara Fregoneze pela confiança depositada na execução deste projeto, pela orientação acadêmica e humanitária, pelo exemplo de altruísmo, afincado pela pesquisa e dedicação ao Laboratório de Neurociências.

Aos queridos mestres que passaram pela minha vida estudantil, a minha primeira professora Telma (*in memoriam*), à professora Maria das Graças, que auxiliou na minha alfabetização e ao professor que me inspirou cursar Biologia, Antônio Santiago.

À Universidade Federal da Bahia, onde tive a oportunidade de graduar-me em Ciências Biológicas, à minha pós-graduação, pela oportunidade de ter convivido com grandes profissionais, como os professores Charbel El Hani, Nora Ney Alves, Hermínia Freitas e Emílio De Castro e Silva (*in memoriam*).

Aos animais, que perderam suas vidas para o desenvolvimento do meu estudo, minha gratidão, carinho e respeito.

Às professoras Carla Patrícia, Rejane Santana, Hilda Ferreira e ao Sr. Vanilson, por terem aberto as portas do laboratório de Neurociências, bem como a disponibilidade em atender as minhas dificuldades.

À minha amiga Ana Isabel Nascimento, pelo incentivo, apoio e auxílio valioso na execução deste trabalho.



Aos colegas do Laboratório pela disponibilidade no auxílio das tarefas diárias, em especial, Marianne Áurea, Rafael Oliveira, Andrei Moiteiro, Emerson Araújo e Matheus Itiel.

Aos pós-graduandos do laboratório de Neurociências, em especial Átila Batista e Lucinez Souza.

Ao Sr. José de Souza pelo cuidado com o Laboratório e com os animais.

Aos queriduchos: Jenilson, Janaína e Maria, pelo sorriso que me arrancavam todos os dias. Muito obrigada pelo carinho.

Aos professores Neilton Amorim, Gúbio Soares e Rodrigo Leão pelo incentivo.

À Ir. Maria Vannozzi pelas orações.

À Dra. Eacy, pelo amparo psicológico.

Aos queridos Gilmara e Frederico pelo valioso apoio nesta reta final.

Aos amados de alma leve que a academia me trouxe: Anderson de Melo (**meu amor, muso e anjo protetor**), Lauriza Santos (**musa inspiradora**) Rafael Leonne (**guerreiro**) Quiara Lovatti (**iluminada**) Lívia Bacelar (**guerreira**), Jailton Júnior, Matheus Itiel, Lusiene Lima Letícia Cruz, Paulo Lucas, Jamile Gomes, Fênix Araújo, Viviane Rodrigues, Carla Fiama, Letícia Simões, Samuel Camargo, Bárbara Moreira, Paula Barbosa, Taíse Lima, Fabiane Carrijo, **Obrigada por trazer calma nos dias de tempestade!**

Aos meus também amados e amigos da vida inteira: Antônio Almeida, Laira Mutti, Rosângela Rocha, por acreditarem, mais que eu, nos meus projetos e sonhos, por nunca me deixarem desistir.

À bibliotecária Sra. Ana Maria Fiscina pela disponibilidade e apoio técnico à correção deste manuscrito.

À Capes pela concessão da bolsa.

“Cada um dia de nós compõe a sua história e cada ser em si carrega o dom de ser capaz, de ser feliz...”

**ABRAÇAÇO!**

CERQUEIRA, Diana Rodrigues. De estudo dos efeitos da interleucina-1beta nos núcleos central e medial da amígdala sobre o apetite por sódio e o papel do sistema serotoninérgico central. 123 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), mediadora da comunicação entre os sistemas imune, endócrino e nervoso central que ao acessar o encéfalo modula funções adaptativas complexas do organismo na manutenção da homeostase, incluindo a atividade do eixo hipotálamo-hipófise na resposta ao estresse, temperatura corporal, comportamento ingestivo e neurotransmissão das monoaminas centrais. Microinjeções de IL-1 $\beta$  no encéfalo promove inibição da sede e do apetite por sódio e a administração periférica e central desta citocina induz um aumento na concentração de serotonina no hipotálamo. A serotonina medeia o controle de várias funções centrais, como a homeostasia hidrossalina. O núcleo central da amígdala (CeA) e o núcleo medial da amígdala (MeA) integram o circuito do comportamento do apetite do sódio e estão envolvidos com as ações homeostáticas e cognitivas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$  na CeA ou na MeA no apetite de sódio em ratos com depletação deste íon e a participação do sistema serotoninérgico central neste efeito. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Ratos Wistar (250g e 270g) foram anestesiados com cetamina/xilazina (80-7 mg/kg, ip) e submetidos a canulação estereotáxica na CeA ou MeA ou CeA e Ventrículo lateral (VL) ou MeA e VL. No dia anterior as sessões experimentais, os ratos receberam injeções de furosemida (20 mg / kg, s.c) e dieta hipossódica (0,001% Na<sup>+</sup> e 0,33% K<sup>+</sup>). Os animais receberam IL-1 $\beta$  nas concentrações de 0,4, 0,8, 1,6 ng / 0,2  $\mu$ l ou veículo na CeA ou na MeA, e a ingestão de salina hipertônica e a de água destilada foram medidas durante 2h. Para testar o envolvimento das vias serotoninérgicas, os ratos receberam para-clorofenilalanina (p-CPA) (200  $\mu$ g/2 $\mu$ l) ou veículo no VL três dias antes das microinjeções de IL-1 $\beta$  na concentração de 1,6 ng / 0,2  $\mu$ l ou veículo, na CeA ou na MeA, e a ingestão de salina hipertônica e água destilada foi medida por 2h. Apenas os dados de ratos cujas cânulas-guia estavam na CeA ou MeA ou CeA e VL ou MeA e VL foram considerados. **RESULTADOS:** Os dados mostram que a microinjeção de IL-1 $\beta$  na CeA ou na MeA inibe o apetite de sódio, sendo o percentual de inibição da IL-1 $\beta$  na CeA maior que na MeA. A inibição é específica para o apetite por sódio e não está relacionado à anedonia ou inabilidade locomotora e, este efeito antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$ , depende do sistema serotoninérgico central. Observa-se também que a IL-1 $\beta$  na CeA ou na MeA promove aumento da temperatura corporal, sendo a hipertermia mais expressiva na MeA. **CONCLUSÃO:** O efeito antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$  depende do sistema serotoninérgico central.

Palavras-chave: Interleucina-1 $\beta$ , Apetite por Sódio, Serotonina, Hipertermia.

CERQUEIRA, Diana Rodrigues. Study of the effects of interleukin-1beta on the central and medial nuclei of the amygdala on sodium appetite and the role of the serotonergic system central. 123 f. il Thesis (PhD in Pathology) - Federal University of Bahia. Oswaldo Cruz Foundation, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mediates the communication between the immune, endocrine and central nervous systems, which, upon access to the encephalon, modulate complex adaptive functions of the organism in the maintenance of homeostasis, including hypothalamic-pituitary axis activity in response to stress, body temperature, ingestive behavior and neurotransmission of central monoamines. IL-1 $\beta$  microinjection into the brain promotes inhibition of thirst and appetite by sodium and the peripheral and central administration of this cytokine induces an increase in the concentration of serotonin in the hypothalamus. Serotonin mediates the control of several central functions, such as hydrosaline homeostasis. The central amygdala nucleus (CeA) and medial amygdala nucleus (MeA) integrate sodium appetite behavior circuitry and they are involved with homeostatic and cognitive actions. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of IL-1 $\beta$  microinjection into CeA or MeA on sodium appetite in sodium depleted rats and the participation of the central serotonergic system in this effect. **MATERIALS AND METHODS:** Wistar rats, weighing between 250g-270g were anesthetized with ketamine/xylazine (80-7mg/kg, ip) and submitted to stereotactic cannulation of the CeA or MeA, or CeA and lateral ventricle (VL) or MeA and VL. The day before the experiments, rats received injections of furosemide (20mg/kg, sc) and low sodium diet (0.001% Na<sup>+</sup> and 0.33% K<sup>+</sup>). The animals received IL-1 $\beta$  at concentrations of 0.4, 0.8, 1.6 ng/0,2 $\mu$ l or vehicle in CeA or MeA and the hypertonic saline and distilled water intakes were measured for 2h. To test the involvement of serotonergic pathways, the rats received p-chlorophenylalanine(p-CPA) (200  $\mu$ g/2 $\mu$ l) or vehicle in VL three days before microinjections of IL-1 $\beta$  at concentration 1.6 ng/0,2 $\mu$ l or vehicle in CeA or MeA and the hypertonic saline and distilled water intake were measured for 2h. Only data from rats whose guide cannulas were in the CeA or MeA or CeA and VL or MeA and VL were considered. **RESULTS:** The data show that microinjection of IL-1 $\beta$  in CeA or MeA inhibits sodium appetite, with the percentage of inhibition of IL-1 $\beta$  in CeA being greater than in MeA. Inhibition is specific for sodium appetite and is not related to anhedonia or locomotor inability, and this antinatriorexigenic effect of IL-1 $\beta$  depends on the central serotonergic system. It is also observed that IL-1 $\beta$  in CeA or MeA promotes an increase in body temperature, being the most expressive hyperthermia in MeA. **CONCLUSION:** The antinatrioregenic effect of IL-1 $\beta$  depends on the central serotonergic system.

Key words: Interleukin-1 $\beta$ , Sodium Appetite, Serotonin, Hyperthermia.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Sinais estimulatórios e inibitórios para o apetite por sódio (autoral)	41
Figura 2	Fotomicrografias típicas da CeA(A) e da MeA (C) (autoral) e diagramas da CeA (B) e da MeA (D) indicando local da microinjeção de IL-1 $\beta$ .	73
Figura 3	Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ na CeA sobre a ingestão de solução salina hipertônica (1,5%) e água destilada em animais depletados de sódio.	75
Tabela 1	Efeito de microinjeções de salina 0,9% na CeA sobre a ingestão de salina hipertônica (1,5%) em animais depletados de sódio (hiponatrêmico) e normonatrêmicos.	76
Figura 4	Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ na MeA sobre a ingestão de solução salina hipertônica (1,5%) e água destilada em animais depletados de sódio.	78
Tabela 2	Efeito de microinjeções de salina 0,9% na MeA sobre a ingestão de salina hipertônica (1,5%) em animais depletados de sódio (hiponatrêmico) e normonatrêmicos.	79
Figura 5	Comparação do percentual do efeito inibitório da IL-1 $\beta$ na CeA e na MeA sobre a ingestão de salina hipertônica (1,5%) em animais depletados de sódio.	81
Figura 6	Teste do campo aberto: efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$ na concentração 1,6 ng/0,2 $\mu$ l, ou salina 0,9%, na CeA ou na MeA sobre a atividade locomotora de ratos depletados de sódio.	82
Figura 7	Teste Hedônico: efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$ na dose 1,6 ng/rato ou salina 0,9% na CeA e na MeA sobre a ingestão de sacarina 0,1% de ratos privados de água por 24 horas	83

Figura 8	Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$ na concentração de 1,6 ng/0,2 $\mu$ l ou salina 0,9% na CeA ou na MeA sobre a temperatura corporal de ratos depletados de sódio.	85
Figura 9	Comparação do percentual do efeito hipertérmico da IL-1 $\beta$ na CeA e na MeA.	86
Figura 10	Efeito da depleção encefálica de serotonina induzida por microinjeções de p-CPA na concentração 200 $\mu$ g/2 $\mu$ l no ventrículo lateral, sobre o efeito antinatriorexigênico de IL-1 $\beta$ na concentração de 1,6 ng/0,2 $\mu$ l; na CeA ou na MeA de ratos com depleção orgânica de sódio.	87
Tabela 3	Efeito da depleção encefálica de serotonina sobre a ingestão de água (mL) de ratos depletados de sódio que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$ na concentração de 1,6 ng/0,2 $\mu$ l ou salina 0,9% na CeA ou na MeA.	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-hidroxitriptofano	5-HTP
ACTH	Hormônio adrenocortitrófico
ALDO	Aldosterona
ANGII	Angiotensina II
AP	Áreas postrema
AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hematoencefálica
BLA	Amígdala Basolateral
BSTL	Núcleo do leito da estria terminal lateral
BSTLM	Núcleo do leito da estria terminal medial
CCK	Colecistocinina
CeA	Amígdala central
Cox-1	ciclooxigenase-1
Cox-2	ciclooxigenase-2
CRH	Hormônio liberador da corticotrofina
DNR	Núcleo dorsal da rafe
DOCA	Deoxicorticosterona
ECA	Enzima conversora da angiotensina
GABA	Ácido gama aminobutírico
GP	Globo pálido
H2S2	11 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2
HHA	Eixo hipotálamo hipófise adrenal
HL	Hipotálamo lateral
i.c.v	Intracerebroventricular
IL-10	Interleucina-10
IL-1RA	Antagonista do receptor interleucina-1
IL-1 $\alpha$	IL-1 alfa
IL-1 $\beta$	IL-1 beta
IL-6	Interleucina-6
INFs	Interferons

LEC	Compartimento líquido extracelular
LIC	Compartimento líquido intracelular
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	<i>Lamina terminalis</i>
mCPBG	meta-clorofenilbiguanida
mCPP	meta-clorofenilpiperazina
MeA	Amígdala medial
MnPO	Núcleo pré-óptico mediano
MNR	Núcleo mediano da rafe
Nacb	Núcleo accumbéns
NK	Células <i>natural killers</i>
NRM	Núcleo magno da rafe
NRO	Núcleo obscuro da rafe
NRPa	Núcleo pálido da rafe
NTS	Núcleo do trato solitário
OT	Ocitocina
OVLT	Órgão vascular da lâmina terminal
PBN	Núcleo Parabraquial
POA	Área pré-óptica
PT	Glândula pineal
PVN	Núcleo paraventricular
SCO	Órgão subcomissural
SFO	Órgão subformical
SLN	Núcleo supraleminiscal da rafe
SON	Núcleo supraóptico
TGFs	Fatores de crescimento mensequimal
TNF s	Fatores de necrose tumoral
VTA	Área tegmentar ventral
LPBN	Núcleo parabraquial lateral
T regs	Células T reguladoras
TLR	Receptores <i>toll like</i>
NOD	Domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização

ASC	Proteína adaptadora associada a apoptose
ENac	canais epiteliais seletivos ao sódio
PFA	Área perifornical
CVOs	Órgãos circunventriculares
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo
p-CPA	Para-clorofenilalanina
ANP	Peptídeo natriurético atrial
PEG	Polietileno glicol
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
4V	Quarto ventrículo
IL-1R	Receptor interleucina-1
MR	Receptor mineralocorticóide
5-HTRs	Receptores serotoninérgicos
AV3V	Região anteroventral do terceiro ventrículo
RVLM	Região ventrolateral do bulbo
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
5-HT	Serotonina
SNC	Sistema nervoso central
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
3V	Terceiro ventrículo
TpOH	Triptofano hidroxilase
VP	Vasopressina
VL	Ventrículo lateral

Nota: as siglas adotadas são as referidas na língua inglesa.



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	21
2.1	CITOCINAS	21
2.2	INTELEUCINA-1BETA (IL-1B): BIOLOGIA E INTERAÇÃO COMO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	23
2.3	IL-1B E APETITE POR SÓDIO	31
2.4	HOMEOSTASIA E APETITE POR SÓDIO	31
2.5	ÁREAS ENCEFÁLICAS DO CIRCUITO DO CONTROLE DO APETITE POR SÓDIO	40
2.6	SISTEMA SEROTONINÉRGICO CENTRAL E APETITE POR SÓDIO	48
2.7	INDUÇÃO E FACILITAÇÃO EXPERIMENTAL DO APETITE POR SÓDIO	55
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	59
3.1.	Objetivos Gerais	59
3.2.	Objetivos Específicos	59
<b>4</b>	<b>HIPÓTESES</b>	60
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	61
5.1	ANIMAIS	61
5.2	CIRURGIA ESTEREOTÁXICAS	61
5.3	DROGAS E MICROINJEÇÕES	62
5.4	HISTOLOGIA	63
<b>6</b>	<b>PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b>	64
6.1	Depleção orgânica de sódio	64
6.2	Teste do campo aberto	64
6.3	Teste de sobremesa	65
6.4	Depleção orgânica de sódio e serotonina	66
6.5	Registro da temperatura corporal	67
<b>7</b>	<b>DESENHOS EXPERIMENTAIS</b>	68
<b>8</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	71
<b>9</b>	<b>RESULTADOS</b>	72
<b>10</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	89
<b>11</b>	<b>PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS</b>	101
<b>12</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	103

# 1 INTRODUÇÃO

As citocinas são mediadores necessários para condução da resposta inflamatória e também da comunicação recíproca entre os sistemas endócrino, imune e nervoso central, fundamentais à manutenção da homeostase (LICINIO e WONG, 1996; WATKINS et al., 1999, GALEA et al., 2007). A citocina pró-inflamatória interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) é sintetizada por diversos tipos celulares quando ativados, incluindo células residentes do encéfalo. Muitos estudos têm demonstrado que a IL-1 $\beta$ , ao acessar o sistema nervoso central, pode modular funções homeostáticas importantes de controle desse sistema, como a temperatura corporal, a pressão arterial, a sede e o apetite por sódio, como também, a neurotransmissão de monoaminas centrais (PA LUZ et al., 2009; SHINTANI, 1993). O receptor IL-1R é encontrado em diferentes regiões do SNC sendo abundante no hipocampo e em áreas hipotalâmicas (QUAN et al., 1993; ROTHWELL e HOPKINS, 1995; DIANA et al., 1999).

O apetite específico por sódio é um comportamento motivado, conservado em muitas espécies de animais e resulta da perda orgânica desse íon. A ingestão de sódio tem por finalidade o restabelecimento da natremia perdida (FITZSIMONS, 1998). O controle central da homeostasia hidrossalina é desencadeado por diversos sinais vindos da periferia que acessam o encéfalo, que integra e processa tais informações, e ativa sinais estimulatórios ou inibitórios, por ação de neurotransmissores e/ou neuromoduladores, através das vias de conexões aferentes ou eferentes e dos receptores localizados nas áreas envolvidas na imbricada rede de regulação desse comportamento (ANTUNES-RODRIGUES, 2004; JOHNSON e THUNHORST, 1997; JOHNSON, 2007). Verifica-se que após tratamento periférico ou microinjeção direta nos ventrículos encefálicos de lipopolissacarídeo (LPS) ou IL-1 $\beta$ , há aumento da atividade neuronal em áreas envolvidas com a regulação da homeostasia hidrossalina como o SFO, o OVLT, o MnPO e a AP (WATKINS et al., 1999; ELMQUIST et al., 1996; KERADI, 1997).

A ação antidipsogênia da IL-1 $\beta$  tem sido demonstrada por vários estudos (DE CASTRO E SILVA, 2006; LUZ et al., 2009). Observa-se que administração periférica de IL-1 $\beta$  resulta em anorexia, adipsia e diminuição da excreção de sódio e de potássio, sem alterar o volume urinário. Ainda se observa que a excreção de sódio induzida pela IL-1 $\beta$  foi suprimida em animais renal desnervado (KANNAN et al., 1996). Em outro estudo, microinjeções de IL-

$1\beta$  inibem a ingestão de água e o pré-tratamento com o antagonista IL-1RA bloqueia esse efeito antidipsogênico (PLATA-SALAMAN e FRENCH-MULLEN, 1992), entretanto, poucos estudos mostram o efeito antinatriorexigênico dessa citocina. Verifica-se que o tratamento com LPS ou IL- $1\beta$ , por via intraperitoneal ou microinjeção em áreas do encéfalo, inibe o apetite por sódio em ratos depletados desse íon (PA LUZ et al., 2006., ALMEIDA, 2011a., CERQUEIRA et al., 2016). Estes estudos demonstram que a IL- $1\beta$  exerce ação inibitória sobre a homeostasia hidrossalina, sugerindo que esta seja sua ação endógena em situações em que esta citocina é comumente liberada. Contudo, os mecanismos pelo qual a IL- $1\beta$  promove tal efeito são pouco conhecidos.

Muitos estudos têm demonstrado que a IL- $1\beta$  pode atuar no sistema nervoso central e modular a atividade de diferentes monoaminas centrais. Verificou-se que o tratamento intraperitoneal ou encefálico com IL- $1\beta$  induz a liberação da serotonina, da dopamina e da noradrenalina e seus metabólitos (SHINTANNI et al., 1993., DUNN, 2006). Dados da literatura mostram que a serotonina participa dos mecanismos inibitórios do apetite por sódio (MENANI et al., 1996., 2002., 2014., CASTRO et al., 2003., CP LUZ et al., 2006, 2007). Áreas envolvidas no controle do apetite por sódio, como o MnPO, PVN, o OVLT, o SFO, o LPBN, o NTS apresentam conexões recíprocas com os núcleos dorsal e mediano da rafe, região onde se encontram os núcleos dos neurônios serotoninérgicos (AZMITIA 1999, 2001., HOYER, 2002).

Estudo mostra que neurônios angiotensinérgicos do SFO se projetam para o núcleo dorsal da rafe, sugerindo que as informações sobre as variações nos níveis de ANGII plasmáticos podem ser detectadas no núcleo dorsal da rafe (TANAKA et al., 1998). Verifica-se também que microinjeções de ANGII diretamente no SFO reduz os níveis extracelulares de serotonina e seus metabólitos (TANAKA et al., 2004). Desse modo, como a IL- $1\beta$  modifica os níveis de serotonina disponíveis, não se descarta a possibilidade de o efeito inibitório dessa citocina sobre o apetite por sódio seja mediado por este neurotransmissor. Entretanto, até o presente momento, não há dados disponíveis mostrando esse possível mecanismo.

Dados da literatura mostram que a depleção encefálica de serotonina 5-HT através da administração sistêmica de p-CPA (inibidor da síntese de serotonina), bem como, lesão do núcleo dorsal da rafe permite estudar a miríade de funções controladas pelo sistema nervoso central de coordenação serotoninérgica, dentre elas o apetite por sódio (REIS, 1994; 2007). Ratos normonatrêmicos ou que recebem injeção intraperitoneal de p-CPA apresentam copiosa

ingestão de salina hipertônica (LIMA et al., 2004) Verifica-se também que ratos depletados de sódio com lesão no núcleo dorsal da rafe apresentam o comportamento de apetite por sódio (OLIVARES et al., 2003). Observa-se em ratos desidratados que a administração intraperitoneal de MK212 ou mCPP, agonistas dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, inibe o apetite por sódio (NEILL e COOPER, 1989). Observa-se também que ratos depletados de sódio, tratados com-CPBG (agonista do receptor 5-HT<sub>3</sub>) apresentam inibição da ingestão de salina (CASTRO, 2003). Observa-se também que ratos depletados de sódio, por diálise peritoneal, ingerem elevado volume de salina hipertônica e seus encéfalos apresentam elevada imunorreatividade à c-FOS no núcleo dorsal da rafe, no LPBN e na AP após ingestão, indicando a ativação neuronal destas áreas que participam da regulação da homeostasia hidrossalina (FRANCHINI et al., 2002). Estes dados corroboram o tônus inibitório da serotonina sobre o apetite por sódio.

## RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Os níveis de IL-1 $\beta$  encontram-se elevados em doenças como câncer, artrite reumatóide e diabetes (HUANG et al., 2001; A.M LEWIS, et al., 2006., LARSEN et al., 2007). Indivíduos acometidos por estas doenças, e outras infecções e/ou inflamações, manifestam mudanças comportamentais associadas aos níveis aumentados dessa citocina como anorexia, adipsia, letargia, anedonia, distúrbios do sono e inabilidade social (KELLEY et al., 2003; DANTZER et al., 2008). Ao conjunto dessas manifestações, aos quais também estão incluídas a febre e as alterações neuroendócrinas, refere-se como comportamento doentio (*sickness behavior*) (DANTZER, 2009). Muitos estudos também mostram o envolvimento da IL-1 $\beta$  em pandemias como obesidade e hipertensão (OSBORNE et al., 2008., CROWLEY e JEFFS, 2016).

Dados da literatura sugerem uma associação entre a IL-1 $\beta$  e doenças como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e a depressão maior, que são caracterizadas pela disfunção da neurotransmissão central (GOSHEN et al., 2008; SHAFTEL et al., 2008; LEAL et al., 2013), bem como evidenciam a ação desta citocina sobre a neurotransmissão de monoaminas (SHINTANI et al., 1993). Existe uma associação entre a IL-1 $\beta$  e a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, comum em indivíduos deprimidos; além disso, observa-se que pacientes que recebem imunoterapia com citocinas frequentemente mostram que os

sintomas associados à depressão têm sido atenuados com suporte de antidepressivos (PINEDA et al., 2012; FELGER e LOTRICH, 2013). Diversos estudos mostram miríade de funções encefálicas sob coordenação serotoninérgica dentre estas, funções cognitivas e a regulação central do apetite por sódio (BUHOT et al., 2000; CASTRO, 2003; MENANI, 1996, 2014; C.P LUZ et al., 2006, 2007).

São poucos os estudos mostrando a ação de IL-1 $\beta$  em áreas encefálicas específicas e envolvidas no controle do sistema nervoso central do apetite por sódio e os poucos estudos publicados mostram que esta citocina promove efeito antinatriorexigênico (P.A LUZ et al., 2009; ALMEIDA, 2011; CERQUEIRA et al., 2016). Além do controle dos líquidos corporais, sabe-se que o sódio está envolvido na manutenção da pressão sanguínea, no equilíbrio ácido-base, no metabolismo da glicose e na síntese protéica (JOHNSON, 2007; MOHAN e CAMPBELL, 2009), de modo que a manutenção dos níveis adequados deste íon é fisiologicamente essencial. Assim sendo, diante do envolvimento do sódio em diversas funções do organismo, a investigação do efeito da IL-1 $\beta$ , que é sintetizada naturalmente em resposta a infecção, inflamação, lesão tecidual ou invasão de agentes agressores, no sistema nervoso central sobre comportamento do apetite por sódio, se reveste de essencial importância.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CITOCINAS

Mediadores clássicos da resposta inflamatória, as citocinas são proteínas ou glicoproteínas hidrossolúveis de baixo peso molecular, variando de 8 a 30kDa, que podem participar também de funções metabólicas e endócrinas (SOMMER e WHITE, 2010). São sintetizadas em resposta à agressão tecidual ou a invasores patógenos e enviam sinais modulatórios, para as diferentes células do sistema imunológico (CURFS et al., 1997; ZHANG e AN, 2007). As citocinas atuam em baixas concentrações, não são armazenadas como moléculas pré-formadas e podem ter ação autócrina, parácrina ou endócrina (VARELLA e FORTE, 2001). São sintetizadas por células distintas do sistema imunológico, tais como macrófagos, monócitos, células-T-CD4, eosinófilos; e outros tipos celulares, como hepatócitos, fibroblastos, miócitos, adipócitos, células gliais e neurônios (BENVENISTE, 1992; WATKINS et al., 1999; VARELLA e FORTE, 2001; HOUFMANN et al., 2001; RAMADORI e ARMBRUST, 2001; COPPACK, 2001).

As citocinas apresentam distintas propriedades, de modo que muitas destas podem agir desencadear múltiplos efeitos sobre mais de um tipo celular (pleiotropia); duas ou mais podem promover as mesmas ações (redundância); potencializam seus efeitos quando agem juntas (sinergia), como podem apresentar efeito contrário (antagonismo) (VARELLA e FORTE, 2001; OLIVEIRA et al., 2011). Ao se ligarem aos receptores específicos, ativam mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica e assim atuam na atividade, na diferenciação, na proliferação e sobrevivência da célula imunológica; bem como a produção e a atividade das citocinas que ou potencializam a resposta inflamatória (pró-inflamatórias) ou atenuam a resposta inflamatória (anti-inflamatórias). As citocinas estão agrupadas em interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNFs), interferons (INFs), fatores de crescimento mesenquimal (TGFs) e quimiocinas (RAEBURN et al., 2002; WHITE et al., 2005). Linfócitos T CD4<sup>+</sup> (células T helper) podem se diferenciar em várias linhagens de células T reguladoras (T regs), incluindo Th1, Th2 e Th17, de modo que essa diferenciação depende dos fatores de transcrição que expressam e os genes que os transcrevem, conforme

definido pelas citocinas do microambiente que essas células são ativadas (SANTARLASCI et al., 2013). Tais moléculas medeiam a comunicação entre células imunes que participam das reações inflamatórias e permitem a comunicação recíproca entre os sistemas imunológico, endócrino e nervoso central (SNC) (RAEBURN et al., 2002). A interação entre estes sistemas promove ajustes finos neuroendócrino, autonômico e comportamental frente a infecções e doenças como câncer, diabetes, hipertensão, artrite reumatóide e depressão (SZELÉNYI, 2001; RICOTE et al., 2004; LARSEN et al., 2007; VAN TESSEL et al., 2013; SCHETT et al., 2016).

Os membros da família interleucina-1 (IL-1) participam ativamente na promoção edesencadeamento das respostas fisiopatológicas, agudas e/ou crônicas, a patógenos e danos teciduais; além disso, a síntese dessas moléculas ocorre por estímulos infecciosos e inflamatórios, sendo assim mediadores da resposta imune inata e do processo inflamatório. A estimulação e a liberação das citocinas pró-inflamatórias são essenciais para início e manutenção da imunidade adquirida (DINARELLO, 1996; 2011; NETEA et al., 2010; SCHETT et al., 2016). Esta é a maior família de citocinas, com onze membros identificados e descritos (IL-1F1 a IL-1F11) (DINARELLO, 2011; GARLANDA et al., 2013; SANTARLASCI et al., 2013; SCHETT et al., 2016; KWAK et al., 2016).

As interleucinas são moléculas intracelulares que carecem de sequência peptídica sinalizadora, sendo necessário o processamento proteolítico para se tornarem moléculas biologicamente ativas, com exceção da IL-1 $\alpha$ , que é a única isoforma secretada, visto que apresenta uma sequência de peptídeos sinalizadores na porção N-terminal hidrofóbica. As citocinas dessa família se ligam a receptores heterodiméricos e uma vez ligados ao receptor, essas interleucinas ativam vias de sinalização intracelular semelhantes, com o recrutamento da proteína adaptadora MyD88 ao receptor Toll-IL-1 (TIR). (GARLANDA et al., 2013; SANTARLASCI et al., 2013; NETEA et al., 2015; KWAK et al., 2016). Sete membros desta família têm atividade agonista (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ ), um com ação anti-inflamatória (IL-37) e três com atividade de receptor antagonista (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38) (GARLANDA et al., 2013; AFONINA et al., 2015; KWAK et al., 2016).

Os receptores dos membros da família IL-1 são proteínas transmembrana caracterizados por apresentar seis cadeias receptoras, com quatro complexos sinalizadores, sendo que dois destes, o IL-1R2 e o IL-18BP não apresentam mecanismos desinalização

intracelular, o que os categoriza como receptores do tipo “decoy” (AKHABIR e SANDFORD, 2010., DINARELLO, 2011b., GARLANDA et al., 2013) e outros dois atuam como reguladores negativos, o TIR8 ou SIGIRR e oIL-1RAcPb (GARLANDA et al., 2013). Os receptores da família IL-1 são classificados como “*Toll-like*” e são importantes por desencadear respostas imunológicas diversificadas como a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) e das proteínascinases ativadas por mitógenos relacionados ao estresse (MAPKs), a expressão de genes inflamatórios e o reconhecimento de agentes invasores (TAKEDA e AKIRA, 2004; ALLAN et al., 2005; SANTARLASCI et al., 2013).

Todas as células do sistema imune inato expressam e/ou são afetadas pelos membros da família IL-1 e as alterações no padrão de expressão destas interleucinas estão relacionadas à progressão das doenças, como também a lesão tecidual ou invasão de patógenos. Além disso, estas citocinas também estimulam a síntese de prostaglandinas e óxido nítrico, estando relacionadas a ações homeostáticas e metabólicas (DINARELLO e WOLF, 1993; DINARELLO, 1996; IGWE et al., 2001., RICOTE et al., 2004; VAN TASSEL et al., 2013; SCHETT et al., 2016). Diante disto, o entendimento da ação das interleucinas permite discorrer sobre como algumas infecções e inflamações se processam, as mudanças comportamentais associadas a esses eventos e as possíveis estratégias terapêuticas (IGWE et al., 2001; LEWIS et al., 2006; GARLANDA et al., 2013).

## 2.2 INTERLEUCINA-1BETA (IL-1β): BIOLOGIA E INTERAÇÃO COM SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Há dois tipos de IL-1 com 17 KDa, a IL-1α e a IL-1β, que exercem diversas atividades biológicas, as quais incluem a promoção de febre, vasodilatação, hematopoiese, ativação linfocitária, quimiotaxia, angiogênese e síntese de anticorpos (GARLANDA et al., 2013). Apesar de apresentarem sequências de aminoácidos homólogas, são codificadas por genes diferentes do cromossomo 2 (DINARELLO, 2012; GARLANDA et al., 2013; KWAK et al., 2016). A transcrição e a tradução do RNAm em proteína precursora pró-IL-1 ocorre após ativação de receptores específicos capazes de reconhecer vias de padrões de reconhecimento de patógenos, tais como receptores *toll like* (TLR) ou após liberação de outras citocinas (WATKINS et al., 1999; NETEA et al., 2015).



A pró-IL-1 $\alpha$  está constitutivamente expressa nas células epiteliais do trato gastrointestinal, nos pulmões, no fígado, nos rins, como também é liberada por células em necrose, o que pode indicar o início rápido de uma cascata de citocinas inflamatórias mediando as fases iniciais da inflamação. A pró-IL-1 $\alpha$  é clivada em IL-1 $\alpha$  pela calpaína II, uma protease de cisteína associada à membrana e dependente de Ca<sup>+2</sup> (CHEN et al., 2007, RIDER et al., 2011; AFONINA et al., 2014; NETEA et al., 2015; SCHETT et al., 2016). A pró-IL-1 $\beta$ , todavia, é inerte, de modo que apenas quando clivada em IL-1 $\beta$ , se torna proteína madura. São dois mecanismos de ativação da pró-IL-1 $\beta$ , o primeiro pela protease de cisteína caspase-1, dependente de inflamossoma, um complexo multiprotéico formado após o reconhecimento de diversos sinais inflamatórios, tais como os padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) e aos patógenos (PAMPs) (ZHOU et al., 2016). Estes inflamossomas apresentam domínios citosólicos composto de receptores de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NOD), mais comumente NLRP3, e a proteína adaptadora associada a apoptose (ASC), que ao reconhecerem o agente lesivo formam um complexo protéico NLRP3/ ASC /pró-caspase-1. Ao se ligar a pró-caspase-1, este complexo induz clivagem a sua forma madura, a IL-1 $\beta$  (NETEA et al., 2015; ZHOU et al., 2016; KWAK et al., 2016., SCHETT et al., 2016). O outro mecanismo de ativação da pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$ , independente da caspase-1 e da ativação de inflamossomas, é mediado por neutrófilos. Tais células fornecem proteases de serina que também processam a IL-1 $\beta$ , dentre elas, a proteinase-3 ou mieloblastina, a elastase, a catepsina G e granzima A, além de outras proteases liberadas por microorganismos invasores como a quimase, a quimiotripsina e ameprina A (SCHETT et al., 2016). Tal mecanismo é de suma importância, uma vez que os neutrófilos são células abundantes no tecido inflamado. A IL-1 $\beta$  é sintetizada por células hematopoiéticas, tais como monócitos e macrófagos sanguíneos, células do sistema imune inato, como as células dendríticas da pele e as *natural killers* (NK), e por células do sistema nervoso, como os neurônios, astrócitos e microglia. É secretada por uma via independente do complexo golgi e retículo endoplasmático (ALAN et al., 2005; GALEA et al., 2007; DINARELLO, 2011a., NETEA et al., 2015)

Os agonistas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  competem pelo mesmo sítio do receptor de membrana IL-1R1, que está expresso em quase todos os tecidos. Este receptor para exercer sua atividade, necessita da proteína acessória IL-1-RAcP, formando um complexo receptor heterodimérico essencial à transdução de sinais; a IL-1 ao se ligar ao receptor, desencadeia suas ações. (DINARELLO, et al., 2000; O'NEILL e DOWER, 2001; ALLAN et al., 2005). O antagonista

endógeno deste receptor, IL-1Ra, está expresso em quase todos os tecidos e compete com IL-1 $\beta$  pelo sítio de ligação, além disso, está presente no soro em maiores concentrações que a IL-1 $\beta$  (ARENDE e GUTHRIDGE, 2000; DINARELLO, et al., 2000). O antagonista IL-1Ra ao se ligar no receptor IL-1R1, inviabiliza o recrutamento da proteína acessória e por consequência, a formação do complexo receptor heterodimérico, logo, não há sinalização intracelular (DINARELLO, et al., 2000; NETEA et al., 2015). IcIL-1RA1, icIL-1RA2, icIL-1RA3, também são antagonistas do receptor IL-1R1, contudo são isoformas intracelulares (PALMER et al., 2002). A manutenção do equilíbrio entre IL-1 e IL-1Ra é importante para prevenção do desenvolvimento ou progressão de doenças inflamatórias (IRIKURA et al., 2002; SGROI et al., 2011).

A IL-1 $\beta$  está presente no organismo em concentrações baixíssimas, e diante de um evento infeccioso ou inflamatório a sua síntese é aumentada. A IL-1 $\beta$  pode acessar o SNC, seja por via sanguínea ou neural (VITKOVIC et al., 2000; STEINMAN, 2004). Esta citocina é importante mediadora na comunicação entre os sistemas imune, endócrino e nervoso central, o que permite ao encéfalo monitorar as alterações orgânicas que ocorrem em condições de doença e coordenar respostas efetoras para manutenção da homeostasia (STEINMAN, 2004). O receptor IL-1R é encontrado em diversas áreas do SNC e ações homeostáticas de controle central podem ser moduladas por esta citocina, dentre as quais a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, a termorregulação, a pressão arterial e o comportamento ingestivo (FARRAR et al., 1987; SHEANA, 2004; KARADI, 2005; TAKÁCS, 2010; GADEK-MICHALSKA et al., 2011). Além disso, diversos estudos mostram o envolvimento da IL-1 $\beta$  na neurotransmissão, no comportamento doentio e na depressão (DANTZER et al., 2008; GOSHER et al., 2008).

Citocinas produzidas na periferia alcançam o encéfalo por vias de acesso distintas, de forma direta ou ativando segundos mensageiros cuja síntese é induzida por estas citocinas; tais vias de acesso não são mutuamente exclusivas e podem depender da localização do estímulo infeccioso/inflamatório e o estado de doença do indivíduo (LICINIO e WONG, 1997). Diversos estudos mostram que injeções periféricas sejam de IL-1 $\beta$  ou de lipopolissacarídeo (LPS), produto da membrana celular de bactérias gram negativas capaz de induzir a ativação de células do sistema imune e sintetizar IL-1, podem levar a ativação de nervos periféricos, mais comumente o nervo vago (BOROVIKOVA et al., 2000; STEINMAN, 2004). Observa-se queratos tratados com injeção intraperitoneal de IL-1 $\beta$  ou

LPS, apresentam sintomas de doença e elevada expressão da proteína c-Fos em eferencias vagais primárias (GOEHLER et al., 1999). Estudo semelhante mostra ratos que ao receberem injeção intraperitoneal de LPS apresentam elevada expressão de RNAm de IL-1 $\beta$  no hipotálamo, no hipocampo, no córtex e na hipófise, enquanto ratos vagotomizados, ou tratados com salina isotônica, por via intraperitoneal, não expressam RNAm de IL-1 $\beta$  nestas áreas encefálicas (HANSEN et al., 1998).

A IL-1 $\beta$  pode acessar o SNC diretamente pelos órgãos circumventriculares (CVOs). Estudos mostram que após injeção intraperitoneal de LPS há aumentada expressão de c-Fos e de RNAm de IL-1 $\beta$  no encefálo, inicialmente em células perivasculares, células meningiais e dos neurônios dos CVOs, tais como o órgão subfornical (SFO), o órgãoovascular da lâmina terminal (OVLT), a área postrema (AP) e a eminência média (QUAN et al., 1994; LICINIO e WONG, 1997., SCHULZ e ENGELHARDT, 2005) e posteriormente, no parênquima encefálico, em áreas com barreira hematoencefálica típica, como o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), o núcleo paraventricular (PVN), a amígdala, o núcleo do leito da estria terminal (BNST), o núcleo parabraquial (PBN), o núcleo do trato solitário (NTS), o córtex, o hipocampo e cerebelo (DAY e AKIL, 1996; TURRIN et al., 2001). Uma vez que tais moléculas não atravessam a BHE, sua acessibilidade também pode dar-se por transportadores específicos ali localizados (BANKS et al., 1995, BANKS 2005; PAN et al., 2011). De forma indireta, IL- $\beta$  pode ativar células endoteliais do plexo coroide bem como células perivasculares a secretarem segundos mensageiros como óxido nítrico, prostaglandinas e até mesmo IL- $\beta$  (MANESS, et al., 1998; CRAGNOLINI et al., 2006; GARCÍA BUENO et al., 2009). A IL- $\beta$  também pode ser produzida por células residentes no SNC, tais como os neurônios, os astrócitos e as células gliais, desta forma, pode modular a liberação de neurotransmissores e hormônios (ROTHWELL et al., 1995., HAOUR et al., 1998; KAMIKAWA et al., 1998; EK et al., 2001).

O receptor IL-1R está difusamente distribuído no SNC, sendo abundante no hipocampo e em áreas do hipotálamo (ROTHWELL e HOPKINS, 1995; DIANA et al., 1999). Estudos com técnicas de autoradiografia mostram distribuição disseminada pelo SNC, com alta densidade destes receptores em regiões como nas células granulares do giro dentado, nas células piramidais do hipocampo, no hipotálamo, no plexo coróide, na hipófise, nas células granulares do cerebelo e nas meninges (FARRAR et al., 1987; BAN et al., 1991). Tal padrão de distribuição indica a presença deste receptor em corpos neuronais de regiões

envolvidas na regulação da temperatura, no comportamento ingestivo e na secreção de hormônios. Através da técnica de hibridização *in situ*, verifica-se a expressão de RNAm para o receptor IL-1R no endotélio vascular, no núcleo basolateral da amígdala (BLA), no núcleo arqueado do hipotálamo, nos núcleos motores trigeminal e no hipoglosso (ERICSSON et al., 1995). Usando a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) seguida de *Southern blotting*, identificou-se expressão de RNAm para o receptor IL-1R em quase todo o encéfalo (PARNET et al., 1994). Sabe-se que para que ocorra a sinalização celular, este receptor precisa da proteína acessória IL-1-RAcP, contudo outra proteína acessória deste receptor é encontrada exclusivamente em neurônios do SNC, a IL-1RAcPb (AcPb) (SMITH et al., 2009).

Muito se tem estudado sobre o estresse e seus mecanismos, em virtude da elevada incidência nas atuais circunstâncias do modo de vida. O estresse é gerado pela percepção de sinais físicos e psicológicos levando a perturbações na homeostasia do indivíduo, que para adaptar-se às situações desencadeia respostas efectoras de luta ou fuga (PALMA et al., 2007). Diversos estudos mostram o envolvimento da IL-1 $\beta$  em eventos comuns às respostas ao estresse, como a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (SAPERSTEIN et al., 1992; VAN DER MEER et al., 1996; LEE et al., 1998; GADEK-MICHALSKA et al., 2011). Para estudar a ação da IL-1 $\beta$  central na mediação dos efeitos imunossupressores do estresse, submetem um grupo de ratos a choques elétricos intermitentes na cauda, por quarenta minutos, e observou-se diminuição na proliferação de linfócitos T e toxicidade de células *natural killers*. Contudo, quando os animais recebem pré-tratamento com injeções intracerebroventricular (i.c.v.) do anticorpo monoclonal da IL-1, que reage com IL-1 $\beta$ , observa-se atenuação da resposta. Os ratos submetidos ao estresse do choque, ao receberem pré-tratamento com injeção i.c.v. de hormônio estimulante de alfa-melanócitos ( $\alpha$ -MSH), que bloqueia os efeitos de IL-1 $\beta$ , a diminuição foi discreta. Ainda neste estudo, ratos que receberam injeções i.c.v. de IL-1 $\beta$  apresentam diminuição na proliferação de linfócitos T e da atividade de células NK enquanto o grupo que recebeu pré-tratamento com anticorpo de hormônio liberador da corticotrofina (CRH) apresenta atenuação desta resposta. Este conjunto de dados sugere que a IL-1 $\beta$  é um mediador relevante da resposta imune ao estresse (SAPERSTEIN et al., 1992). Em outro estudo, ratos que ao receberem injeção intraperitoneal ou i.c.v. de IL-1 $\beta$  apresentam aumento na secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e CRH (VAN DER MEER et al., 1996). Gadek-Michalska e colaboradores (2011) mostram em seu estudo que ratos submetidos ao estresse de contenção apresentam aumento nos níveis

plasmáticos de IL-1 $\beta$ , de ACTH e de corticosterona, além do aumento na expressão de c-Fos no córtex pré-frontal, no hipotálamo e no hipocampo.

A IL-1 $\beta$  foi descrita primeiramente como “pirógeno endógeno” pela capacidade de induzir elevação rápida e sustentada da temperatura corporal. O aumento da temperatura é um dos primeiros sintomas a surgir em indivíduos acometidos por infecções e/ou inflamações, e pode ser interpretado como estratégia adaptativa do organismo para combater o patógeno (KLUGER et al., 1998). Após contato com agentes infecciosos e/ou inflamatórios, as células do sistema imunológico são acionadas à liberação de citocinas, por conseguinte, a febre resulta da comunicação entre o sistema imune e o SNC (DINARELLO, 1994). Inúmeros estudos relatam o envolvimento dessa citocina na gênese da febre. A IL-1 $\beta$ , IL-6 e o TNF- $\alpha$  são os principais pirógenos endógenos que agem principalmente na região do hipotálamo anterior desencadeando diversas respostas fisiológicas que culminam com a febre (DINARELLO, 1994; KLUGER et al., 1998; LEDEBOER et al., 2002). Na ativação do sistema imune também há liberação de anti-pirógenos endógenos modulam o aumento da temperatura corporal, impedindo que esta alcance níveis lesivos ao organismo (KLUGER et al., 1998). Ledebøer e colaboradores (2002) mostram que ratos que recebem injeção intravenosa IL-10 apresentaram atenuação da resposta de febre induzida por injeção intravenosa de LPS, como também supressão da síntese de IL-1 $\beta$  em tecidos periféricos, no plasma e no tronco cerebral. Em estudo semelhante, ratos com deleção gênica para IL-10 (*IL-10*<sup>-/-</sup>) apresentam febre alta e prolongada em resposta ao tratamento com LPS, além do aumento de IL-6 e TNF- $\alpha$ , quando comparado aos ratos selvagens. Os ratos *IL-10*<sup>-/-</sup>, após injeções de IL-10 apresentaram hipotermia profunda, assim, estes dados sugerem que a IL-10 age como um antipirético endógeno após a exposição ao LPS (LEON et al., 1999).

A IL-1 $\beta$ , é a principal indutora da síntese de IL-6 (ZETTERSTROM et al., 1998). Verifica-se que camundongos com deleção gênica para IL-6 (*IL-6*<sup>-/-</sup>), tanto a injeção intravenosa quanto a injeção central de IL-1 $\beta$  ou LPS foram ineficientes em promover a febre (CHAI et al., 1996). Corroborando tal informação, Cartmell e colaboradores (2000) mostram que ratos com febre induzida por injeção subcutânea de LPS apresentam aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 no líquido cefalorraquidiano, supostamente atuando em sinergia no SNC para desencadear a resposta de febre. Evidenciando a ação conjunta destas citocinas, Leon e colaboradores (2002) mostraram que injeção intravenosa do antagonista IL-1Ra, atenua o estado febril induzido tanto por injeção de LPS, quanto por injeção de IL-6.

Indivíduos acometidos por doenças apresentam, além da febre, redução do apetite e da ingestão de alimentos nas fases aguda e crônica respostas inflamatórias, e embora haja diminuição no consumo de alimentos, há também redução do gasto energético, o que pode ser considerado uma estratégia do organismo frente ao estado doente. A IL-1 $\beta$  parece agir na mediação de alterações metabólicas e nutricionais, comuns na resposta infecciosa/inflamatória, necessárias para manutenção do equilíbrio energético (MCCARTY et al., 1985; BRET-DIBAT et al., 1995; PARNET et al., 2002). Ratos submetidos a injeções i.c.v. de IL-1 $\beta$ , por quatro dias, apresentam redução contínua da ingestão de alimentos, perda de peso e níveis plasmáticos de IL-6 e corticosterona aumentados, sugerindo que a exposição crônica do SNC a esta citocina é suficiente para induzir anorexia e caquexia (FINCK e R.W JOHNSON, 1997).

O hipotálamo é a área do SNC que integra as informações nutricionais. Seus neurônios são sensíveis a IL-1 $\beta$ , a grelina, a CCK e a leptina (LENARD e BERTHOUD, 2008). Para mostrar a ação da IL-1 $\beta$  sobre o metabolismo energético, Gonzalez e colaboradores (2006) investigaram a ação da grelina, hormônio orexigênico importante na mediação da regulação central da ingestão de alimentos e saciedade. Neste estudo, injeção i.c.v. de IL-1 $\beta$  promove supressão alimentar por 24 horas, em ratos com 20 horas de jejum, e o pré-tratamento com injeção i.c.v. de grelina reduziu o efeito anorexigênico da IL-1 $\beta$  por 24 horas, sugerindo que a grelina é um peptídeo orexigênico capaz de antagonizar a anorexia induzida por IL-1 $\beta$ . Outros estudos sugerem interação dos efeitos da colecistocinina (CCK) e IL-1 $\beta$ . Injeção intravenosa de CCK promove ativação das vias aferentes vagais gástricas e esta ativação é potencializada por injeção intravenosa de IL-1 $\beta$  (BUCINSKAITE et al., 1997), Corroborando tal dado, Kurosawa e colaboradores (1997) mostraram que ao administrar, por via intravenosa, L-364-718 (devaizepida), antagonista do receptor CCK tipo A (CCKA) há diminuição da atividade das aferências vagais gástricas induzida por IL-1 $\beta$ . Verifica-se que ratos privados de água e de alimento por 24 horas, após receberem microinjeção de IL-1 $\beta$  no hipotálamo ventromedial (VMH), apresentaram inibição da ingestão de água, de alimentos e perda de peso (KENT, et al., 1994). Estudos semelhantes, ratos submetidos aos mesmos protocolos, mas com microinjeção de IL-1 $\beta$  na região ventromedial do globo pálido ou no núcleo accumbens (Nac) também apresentam inibição da ingestão de água, de alimentos e perda de peso (KERADI et al., 2005; TAKÁCS, 2010).

A sede é uma sensação subjetiva que surge da necessidade de água do organismo e constitui um mecanismo de defesa para aumentar a ingestão de água, a fim de restabelecer a homeostasia hídrica. Em resposta a percepção ao aumento da osmolaridade e da diminuição do volume dos líquidos corporais, é o único mecanismo comportamental eficiente para correção do volume, assim sendo, fundamental para manutenção da osmolaridade e a regulação da pressão sanguínea à longo prazo. (FITZSIMONS, 1998). A adpsia é frequente em indivíduos doentes, logo, não se descarta a possibilidade de que a IL-1 $\beta$  endógena possa desempenhar importante papel fisiológico no controle da homeostasia hídrica em circunstâncias nas quais esta citocina é naturalmente liberada (PLATA-SALAMAN, 1989; OSAKA et al., 1992). Dados da literatura mostram que a IL-1 $\beta$ , administrada via intraperitoneal ou i.c.v., promove efeito antidipsogênico significativo, seja em ratos com desidratação intracelular ou desidratação extracelular (SONTI et al 1997; DE CASTRO e SILVA et al., 2006; PA LUZ et al., 2009). Observa-se que microinjeção de IL-1 $\beta$  na área pré-óptica inibe a ingestão de água em ratos com desidratação extracelular e o tratamento com ácido acetilsalicílico reverte o efeito antidipsogênico da IL-1 $\beta$ , sugerindo que este efeito é mediado por prostaglandinas (CALAPAI et al., 1997).

Diversos estudos do laboratório de Neurociências (ICS/UFBA) mostram a participação de vários neurotransmissores/ neuromoduladores no controle da homeostasia hídrica. Ao investigar a ação desta citocina sobre a ingestão hídrica, verifica-se que ratos submetidos a três protocolos distintos para indução da sede, que são privação hídrica por 24h, a injeção subcutânea de polietilenoglicol (PEG) e a sobrecarga intragástrica de sal, apresentam inibição da ingestão de água após injeção i.c.v. de IL-1 $\beta$ ; tal efeito parece depender de um componente opioide endógeno, visto que o pré-tratamento com naloxona, antagonista opioide não seletivo, inibe o efeito antidipsogênico desta citocina (DE CASTRO e SILVA et al., 2006; PA LUZ et al., 2006). A adpsia é uma manifestação clássica de indivíduos acometidos por infecções e/ou inflamações em resposta ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ . Esses dados corroboram com os apresentados na literatura, bem como mostram a interação recíproca do sistema imunológico com o sistema nervoso central.

### 2.3 IL-1 $\beta$ E APETITE POR SÓDIO

Poucos estudos mostram a ação das citocinas no apetite específico por sódio, embora o efeito antidiaprogênico da IL-1 $\beta$  seja conhecido. Dados da literatura mostram que injeção intraperitoneal ou i.c.v., seja de LPS ou de IL-1 $\beta$  promove efeito antinatriorexigênico (PA LUZ, et al., 2009; RL ALMEIDA et al., 2011a). Durante a resposta inflamatória, quando a IL-1 $\beta$  é comumente liberada, hormônios envolvidos na homeostasia podem ser secretados (CARNIO et al., 2006). Em estudo mimetizando infecção sistêmica, ratos depletados de sódio e tratados com captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), que recebem injeção intraperitoneal de LPS apresentam inibição do apetite por sódio e da excreção de sódio, mas tais achados não foram conclusivos para afirmar se a inibição da ingestão de sódio é um efeito direto do LPS ou secundário à redução da excreção de sódio (RL ALMEIDA et al., 2011a). Em estudo semelhante, observou-se que os ratos também depletados de sódio e tratados com captopril, ao serem pré-tratados com injeção intraperitoneal de ioimbina ou com injeção i.c.v. de RX-821002, antagonistas seletivos dos adrenoreceptores tipo alfa 2 (R- $\alpha$ 2), não apresentam inibição da ingestão de salina hipertônica (RL ALMEIDA et al., 2011b). A conservação renal de água e sódio, bem como a inibição da sede e do apetite por sódio são alterações na homeostasia hidrossalina manifestadas no comportamento doente e tais manifestações podem ser mediadas por R- $\alpha$ 2 proencefálicos (DE LUCA JR et al., 2016). Ao investigar a ação direta da IL-1 $\beta$  no SNC sobre o apetite por sódio, Luz e colaboradores (2006) observaram que ratos depletados de sódio que recebem injeção i.c.v. de IL-1 $\beta$ , não manifestam o apetite por sódio. Neste estudo, o pré-tratamento com naloxona, impossibilita o efeito antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$ , sugerindo a participação dos opioides centrais na mediação deste comportamento (PA LUZ et al., 2006).

## 2.4 HOMEOSTASIA HIDROSSALINA E APETITE POR SÓDIO

O conjunto de ações coordenadas pelos sistemas nervoso, endócrino e efetores, para manutenção dos níveis adequados de água e sódio, entre outros, no organismo, de forma a assegurar a integridade de processos fisiológicos essenciais é referido como homeostasia. Este conceito foi desenvolvido por Claude Bernard em 1865, ao entender que os indivíduos apresentam mecanismos internos de regulação para manutenção constante do equilíbrio; porém, o termo homeostasia foi definido por Water Bradford Cannon em 1932 (GOLDSTEIN, 2010). O sódio é essencial aos processos fisiológicos e diante da necessidade



orgânica deste íon, os animais o procuram nos seus ambientes naturais. As estratégias comportamentais para aquisição de água e sódio são mecanismos importantes para manutenção da homeostasia hidrossalina.

Água e eletrólitos estão distribuídos nos compartimentos líquidos corporais intracelular e extracelular (LIC e LEC, respectivamente). A regulação primária da homeostasia hidrossalina ocorre pelo ajuste fino entre ingestão e excreção de água e eletrólitos pelos rins. Os mamíferos apresentam níveis estreitos de osmolaridade plasmática e quaisquer alterações no volume e concentração de íons dos líquidos corporais podem afetar a integridade de células, tecidos e a atividade de macromoléculas que mantêm a vida. (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; BOURQUE, 2008). O sódio no LEC promove gradiente de pressão osmótica e através das membranas celulares, conduz o movimento da água a fim de equilibrar a osmolaridade entre os compartimentos. (VERBALIS, 2003; DANIELS e FLUHARTY, 2004). Além de participar da comunicação celular, o sódio atua no controle do volume dos líquidos corporais e manutenção da pressão arterial, que são reguladas por sistemas precisos, que envolve respostas encefálicas, endócrinas, cardiovasculares e renais (MOHAM e CAMPBELL, 2009). Níveis adequados de sódio são importantes também para o equilíbrio ácido-base, a excitabilidade de células nervosas, o metabolismo da glicose e a síntese protéica. Portanto, desvios nas variáveis hidrossalinas desencadeiam respostas homeostáticas precisas às alterações no volume e na osmolaridade dos líquidos corporais de modo a restabelecer as concentrações ótimas das variáveis perdidas. A homeostasia hidrossalina é mantida pela regulação da distribuição e da concentração da água e eletrólitos nos meios intra e extracelular e a sinergia entre sistemas fisiológicos e fatores comportamentais (JOHNSON, 2007; HURLEY e JOHNSON, 2016).

Inúmeras condições patológicas e fisiológicas, que alteram o microambiente do LIC e do LEC, ativam vias que conduzem as informações ao SNC e então as respostas efetoras são acionadas (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; BOURQUE, 2008). Diante da perda de água, comum em situações de vômito, diarreia, diabetes mellitus e poliúria, têm-se desidratação e diminuição do volume LIC e, em seguida do LEC, criando uma condição de hipernatremia que desencadeia a sensação de sede e promove a ingestão de água, a liberação de vasopressina (VP) e a reabsorção de água pelos rins (KREIMEIER, 2000; STACHENFELD, 2008; BOURQUE, 2008). Ao contrário do que ocorre em situações de sudorese excessiva, onde há perda de sódio e outros eletrólitos, desencadeia a avidez e apetite

por sódio, supressão da secreção de VP, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e diminuição da excreção de sódio pelos rins (JOHNSON e THUNHORST, 1997; BOURQUE, 2008; HURLEY e JOHNSON, 2013). A sede e o apetite por sódio são mecanismos comportamentais para correção de perdas orgânicas de água e de sódio e manutenção da homeostasia hidrossalina. (JOHNSON e THUNHOST, 1997; FITZSIMONS, 1998; MORRIS et al., 2008; GEERLING e LOEWY, 2008).

O apetite por sódio é um comportamento inato caracterizado pela busca motivada, aquisição e ingestão de soluções ou alimentos ricos em sódio, normalmente aversivos, em resposta a diminuição das concentrações orgânicas deste íon. Este comportamento é conservado entre os vertebrados terrestres, sendo desencadeado por hiponatremia e hipovolemia (FITZSIMONS, 1998; GEERLING e LOEWY, 2008; DE LUCA JR et al., 2010; GREENWOOD et al., 2014). Tal comportamento apresenta primeiro a fase do apetite, caracterizada pela busca do animal ao objeto de desejo e na sequência, a fase da saciedade, promovida pelo estímulo do objeto de desejo e seu consumo (BERRIGDE et al., 2009; CASTRO e BERRIGDE, 2014). Informações de volume e osmolaridade dos líquidos corporais, oriundos da periferia, chegam ao SNC e ativam células especializadas no monitoramento da osmolaridade, os osmorreceptores, que detectam variações de natureza química e mecânica do interstício, transformado em sinais e conduzido ao SNC (JOHNSON, 2007). Os osmorreceptores estão localizados em regiões estratégicas na periferia, como a língua, a cavidade orofaríngea, no sistema porta-hepático e nos rins, como também no SNC, em regiões periventriculares desprovidas de barreira hematoencefálica efetiva como os órgãos circumventriculares (CVOs), que incluem a área postrema (AP), o órgão subfornical (SFO), o órgão vasculoso da lamina terminalis (OVLT), região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), além de áreas no parênquima encefálico importantes por sua função integradora como o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), o núcleo supraóptico (SON), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e a porção caudal do núcleo do trato solitário (NTS) (JOHNSON e THUNHORST, 1997; MCKINLEY et al., 2004; BUNDZIKOVA et al., 2008; BOURQUE, 2008).

Variações no sódio plasmático ativam canais de sódio específicos  $Na_x$ , expressos nos CVOs, em astrócitos e células gliais, que sinalizam tais inconstâncias aos neurônios envolvidos na homeostasia do sódio (GROB et al., 2003; E WATANABE et al., 2006; NODA, 2006; 2007, NODA e HIYAMA, 2014; MATSUDA et al., 2017). Diversos estudos

mostram a importância dos canais  $Na_x$  na homeostasia do sódio. Observou-se que camundongos, com expressão do gene para o canal de sódio  $Na_x$  inativada (*Knockout*), submetidos ou não a privação hídrica, apresentam robusta ingestão voluntária e preferencial de salina hipertônica em relação a sacarose, ao ácido clorídrico e ao cloreto de quinino, quando comparados a camundongos selvagens. Ainda neste estudo, a transecção da corda timpânica e do nervo glossofaríngeo, nervos especializados na percepção do sabor salgado, não modificou a ingestão espontânea de salina hipertônica nestes camundongos (U WATANABE et al., 2003). Os camundongos *knockout* para  $Na_x$  quando depletados de sódio apresentam excessiva ingestão de salina hipertônica (NODA et al., 2006) e após injeção de salina hipertônica no terceiro ventrículo encefálico (3V) não apresentaram ingestão de água como o esperado (HIYAMA et al., 2004). Assim, atribui-se ao canal  $Na_x$  a função de receptor seletivo para sódio no SNC (E WATANABE et al., 2000; HIYAMA et al., 2004).

Informações sensoriais pré-ingestivas contribuem para o início e a manutenção do comportamento do apetite por sódio, uma vez que ativam áreas cerebrais e mecanismos envolvidos na motivação da recompensa (CASTRO e BERRIGDE, 2014; KRAUSE e SAKAI, 2007). O sabor salgado ativa inicialmente os canais epiteliais seletivos ao sódio (ENaC) localizados na língua e na extensão da cavidade orofaríngea, onde as informações são conduzidas pelos nervos facial (VII), glossofaríngeo (IX) e vago (X) ao SNC (BOUGHTER JR e BACHMANOV, 2007). Estudos apontam a corda timpânica, ramo do nervo VII, como o principal nervo por onde trafega informações sobre sabor salgado e a principal via de acesso desta informação ao SNC (BOUGHTER JR e BACHMANOV, 2007; GEERLING e LOEWY, 2008; SPECTOR et al., 2010). Corroborando esta informação, ratos com transecção da corda timpânica apresentam inabilidade de identificar o sabor salgado e após a reinervação, tal capacidade é recuperada (SPECTOR et al., 2010). Observa-se que lesão eletrolítica no NTS interrompe o aumento da palatabilidade ao sódio, suprimindo a expressão do apetite por sódio em ratos depletados deste íon (FLYNN et al., 1991).

Células sensíveis a variações do volume e pressão informam constantemente mudanças nos meios intra e extracelular, e são importantes para o monitoramento da pressão sanguínea. São células sensoras em regiões estratégicas os mecanorreceptores, localizados em regiões de alta ou baixa pressão, presentes no leito de grandes vasos; os receptores cardiopulmonares, localizados em regiões de baixa pressão sanguínea como átrios cardíacos, vasos pulmonares e regiões do sistema circulatório de baixa pressão e os baroreceptores,

localizados em regiões de alta pressão sanguínea como arco aórtico, região sino-aórtica e arteríolas aferentes renais e regiões do sistema circulatório de alta pressão arterial (JOHNSON e THUNHORST, 1997; FITZSIMONS, 1998; ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). Dados da literatura corroboram a importância dos receptores de volume e pressão na homeostasia dos compartimentos líquidos corporais. Ratos com denervação dos seios carotídeos e dos arcos aórticos quando depletados de sódio, não apresentam o comportamento de apetite por este íon após 48 horas da depleção (THUNHORST et al., 1994). Em outro estudo, ratos submetidos à denervação sino-aórtica, a ressecção laríngea e a remoção dos gânglios simpáticos cervicais e também depletados de sódio, não apresentam ingestão de salina hipertônica quando comparados ao grupo cujos procedimentos foram mimetizados (*sham*) (ROCHA et al., 1993).

Informações osmosensoras viscerais, de receptores de volume e pressão e sensações gustatórias acessam o encéfalo através do pares de nervos VII, IX e X, facial, glossofaríngeo e vago, respectivamente, que se projetam diretamente para o NTS, onde ocorre a primeira integração e processamento de todas as informações periféricas, e desta área para núcleo parabraquial (PBN). A partir do PBN, diversas conexões dirigem-se para áreas prosencefálicas, mesencefálicas e romboencefálicas que integram a complexa rede neural de controle da homeostasia hidrossalina, ativando mecanismos regulatórios estimulatórios ou inibitórios que modulam as respostas osmoregulatórias necessárias para aperfeiçoar a homeostasia, uma vez que diferentes tipos de perturbações no equilíbrio desencadeiam diferentes tipos de respostas efetoras combinadas ou não (DANIELS e FLUHARTY, 2005; KRAUSE e SAKAI, 2007; BOURQUE, 2008).

O comportamento de apetite por sódio é controlado por informações sensoriais da periferia, sendo que os níveis de sódio são monitorados desde a sua ingestão até sua diluição no LEC. Assim, as informações pré e pós-ingestivas são importantes nos mecanismos de controle do apetite de sódio. Sinais pós-ingestivos participam da inibição do comportamento de apetite por sódio, informando ao SNC, por retroalimentação, via aferência do nervo vago. Tais sinais limitam a ingestão em indivíduos com apetite por específico sódio, por vezes antes do restabelecimento da natremia normal, e são decorrentes da passagem do líquido pelo duodeno e jejuno proximal (BOURQUE, 2008; GEERLING e LOEWY, 2008; KRAUSE et al., 2010). Ratos que tratados com injeção subcutânea de ANG II mostram maior volume ingerido de salina hipertônica quando apresentam fístula gástrica aberta, sugerindo que fatores

orofaríngeos e pós-ingestivos interagem no controle do apetite por sódio induzido por ANGII (SALISBURY et al., 1987). Em outro estudo, ratos com fístula gástrica e depletados sódio apresentam maior volume ingerido de salina hipertônica quando comparados a animais sem fístula e também depletados de sódio, mostrando assim a necessidade dos sinais pós-ingestivos para saciação do apetite por sódio. (KRAUSE et al., 2010). Ratos com remoção das glândulas adrenais (adrenalectomizados) e com fístula gástrica aberta apresentam maior volume ingerido de salina hipertônica, independente das concentrações, quando comparados a animais adrenalectomizados com fístula gástrica fechada. Estes achados sugerem que o preenchimento gastrointestinal produz estímulos inibitórios para o consumo de soluções, independente das concentrações (STRICKER e HOFFMANN, 2006).

Mecanismos hormonais participam diretamente da regulação da homeostasia hidrossalina. Diante da hipovolemia e hiponatremia induzidas pela depleção de água edesódio, o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) é ativado, independente do controle central, para manutenção do equilíbrio entre os compartimentos líquidos. Entretanto, a angiotensina II (ANGII) atua nos CVOs, ativando a rede neural que modula a pressão arterial e a liberação de VP e estimula a sede e apetite por sódio (FITZSIMONS, 2008; MCKINLEY, 2004; DANIELS e FLUHARTY; 2004; GEERLING e LOEWY, 2008). O SRAA é acionado quando ocorre diminuição da pressão arterial, a diminuição da percepção do sódio pela mácula densa e a ativação simpática. Frente a estes eventos, a renina é liberada atuando sobre o seu substrato, o angiotensinogênio, convertendo-o em angiotensina I (ANGI), que clivada é pela ação da enzima conversora da angiotensina (ECA), convertendo-se em ANGII, com potente ação vasopressora, indutora da sede e do apetite por sódio e da secreção de ALDO (FORMENTI et al., 2009).

Todos os componentes do sistema renina angiotensina (SRA) são também sintetizados no encéfalo e os receptores de angiotensina do tipo 1 (AT<sub>1</sub>) são distribuídos em áreas importantes da regulação central da homeostasia hidrossalina e cardiovascular (MCKINLEY et al., 1992; 2004). Variações nas concentrações de ANGII e ALDO ativam mecanismos neuroendócrinos facilitatórios para correção da homeostasia (DANIELS e FLUHARTY, 2005). Diversos estudos mostram a ação facilitatória dos hormônios do SRA para o apetite por sódio. Avrith e Fitzsimons (1980) observaram que ratos normovolêmicos enormonatrêmicos ao receberem microinjeções i.c.v. ou na área pré-óptica (POA) de ANGII ou renina, apresentam robusta ingestão de solução salina hipertônica (2,7%). Em estudo

semelhante, ratos também normonatêmicos, que recebem injeções de captopril, fármaco inibidor ECA ou de salarasin, antagonista inespecífico dos receptores da angiotensina, não apresentam o apetite por sódio induzido por microinjeções i.c.v. ou na POA de renina (AVRITH e FITZSIMONS, 1983). Demonstrou-se que ratos normonatêmicos que recebem microinjeções i.c.v. de renina apresentam elevada imunoreatividade a c-Fos e Erg-1, proteínas marcadoras da atividade neuronal imediata e tardia, respectivamente, nos órgãos periventriculares (XUE e JOHNSON, 1998). Corroborando estes dados, observou-se que ratos depletados de sódio tratados com injeção intravenosa (i.v.) de ANGII apresentam copioso apetite por sódio e elevada expressão da proteína c-Fos no OVLT, SFO, MnPO, PVN e SON (LANE et al., 1997).

Outro componente do SRAA importante para a homeostasia hidrossalina é a aldosterona, hormônio mineralocorticóide secretado pelo córtex das glândulas adrenais que atua nos rins aumentando a reabsorção do íon sódio e excreção de potássio e íons de hidrogênio. As concentrações da ALDO são inversamente proporcionais a osmolaridade plasmática, e a dieta privativa de sódio é estímulo potente para secreção deste hormônio (GEERLING e LOEWY, 2008). O comportamento ingestivo estimulado por mineralocorticóides é exclusivo para o apetite por sódio, em contraste com a ANGII que estimula tanto o apetite por sódio quanto a sede (GEERLING e LOEWY, 2006). Na primeira metade do século XX, estudos pioneiros com animais adrenalectomizados foram realizados por Curt Richter. Ratos adrenalectomizados apresentam robusta ingestão de salina hipertônica e quando recebem implantes de tecido da glândula adrenal, o apetite por sódio é suprimido (Richter, 1930). Em estudo semelhante, ratos adrenalectomizados apresentam perda de apetite e peso, livre e ávido consumo de solução salina hipertônica. O apetite por sódio é atribuído às deficiências endócrinas ou alterações patológicas em distintas regiões do organismo (RITCHER, 1936; 1939). Em estudo mais recente, ratos também adrenalectomizados e privados de salina hipertônica por 24 horas apresentam rápida ingestão de solução salina hipertônica e esvaziamento gástrico lento, de modo que a concentração da salina ingerida determinava a velocidade de esvaziamento gástrico e o fim da ingestão. Tais resultados indicam que estes animais detectam variações no volume e na concentração da salina ingerida de forma pré-sistêmica (BYKOWSKI et al., 2007).

Estudos demonstram que a ALDO pode atuar no SNC para controlar o apetite por sódio. O acetato de deoxicorticosterona (DOCA) é amplamente utilizado nos estudos do

apetite por sódio por estimular a ingestão de salina hipertônica com padrão semelhante a ALDO. Observou-se que ratos normonatrêmicos após receberem injeções subcutâneas por quatro dias consecutivos de DOCA, apresentam aumento progressivo na ingestão de salina hipertônica e elevada expressão de c-Fos no MnPO ventral e OVLT e quando depletados de sódio e tratados com microinjeção i.c.v. de DOCA, os ratos apresentaram copiosa ingestão de salina hipertônica (LANE et al., 1997). Outros estudos mostram que ratos normonatrêmicos ou depletados de sódio que apresentam lesão na AV3V, ao receber i.c.v. de renina ou injeções subcutâneas de DOCA por três dias consecutivos, apresentaram ingestão de salina hipertônica leve e robusta, respectivamente (DE LUCA JR et al., 1992). Estudos mostram que a ANGII e a ALDO podem atuar de forma sinérgica para estimular o apetite por sódio, com menor latência e maior magnitude do que seria produzido com maiores quantidades de cada um dos hormônios separados (FLUHARTY e EPSTAIN, 1983; DE LUCA JR et al., 1992). Observou-se que ratos normonatrêmicos ou depletados de sódio, ao receberem injeções subcutâneas de DOCA e de ANGII apresentam volume ingerido equivalente ao somatório das ingestões individuais induzidas por cada hormônio, e os ratos depletados de sódio apresentaram maior expressão de c-Fos no OVLT, MnPO e SFO quando comparados aos tratamentos individuais com estes hormônios (LANE et al., 1997).

Receptores para ANG II e ALDO estão distribuídos em áreas distintas no SNC, de modo que a ingestão de salina hipertônica pode ser estimulada pela ativação dos receptores individuais ou em conjunto (DE LUCA JR et al., 1992; GEERLING e LOWEY, 2006). ALDO e DOCA agem em receptores mineralocorticóides (MR) específicos. Poucas áreas cerebrais são sensíveis a mineralocorticóides, e esta sensibilidade é dependente da coexpressão do receptor MR, da enzima 11 $\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (HSD2), que é indispensável à inativação de glicocorticóides que competem pelo sítio do receptor MR, e de fácil acessibilidade à aldosterona. Os neurônios que atendem a estes três critérios são seletivamente responsivos à aldosterona e referidos como HSD2 (GEERLING e LOEWY, 2006; HAQUE et al., 2015). Estudo imunohistológico identificou neurônios HSD2 nas regiões dorsomedial e vascular do NTS, tanto em animais adrenalectomizados privados de sódio quanto os depletados deste íon. Em contrapartida, quando estes animais tiveram acesso a alimento e solução salina com elevada concentração de sódio, os neurônios HSD2 do NTS foram inativados (GEERLING et al., 2006).

Outros hormônios envolvidos na homeostasia hidrossalina são a vasopressina (VP), a ocitocina (OT) e o peptídeo natriurético atrial (ANP) que apresentam papel inibitório no apetite por sódio. A VP e a OT são sintetizadas por neurônios magnoceulares do PVN e SON do hipotálamo e liberados na circulação pela neurohipófise; são secretados em resposta a redução do volume do LEC ou aumento da osmolaridade plasmática. A VP coordena a migração dos canais de aquaporina, do citoplasma para membrana celular das células dos túbulos renais, para promover a reabsorção de água, ea OT junto com o ANP promove aumento na retenção de sódio pelos rins e inibição do comportamento ingestivo (FITZSIMONS, 1998; ANTUNES-RODRIGUES, 2004). Verifica-se que ratos depletados de sódio que recebem VP i.c.v. apresentam diminuição da ingestão de salina hipertônica quando comparados ao grupo controle, mas não há supressão do apetite por sódio (SATO et al., 1997). Observa-se que ratos tratados com injeções subcutânea de DOCA por sete dias, e depletados de sódio por 24 horas, quando recebem microinjeção i.c.v. de VP, apresentam diminuição da ingestão de salina hipertônica, mas não a supressão do comportamento. Em contrapartida, o pré-tratamento com microinjeções i.c.v. de TV-AVP, ([d(CH<sub>2</sub>)<sup>5</sup> 1,O-Et-Tyr<sup>2</sup>,Val<sup>4</sup>, Arg<sup>8</sup>] VP), antagonista inespecífico dos receptores da vasopressina V<sub>1</sub> e V<sub>2</sub>, inativabiliza o efeito da VP (FLYNN et al., 2001). Diversos estudos sugerem que a ocitocina também apresenta efeito inibitório sobre o apetite por sódio (BLACKBURN et al., 1992a; 1992b, STRICKER e VERBALIS, 1996; 2004). Observa-se que ratos normonatrêmicos que recebem microinjeção de ANGIO II i.c.v. apresentam pronunciado apetite por sódio e aumento da expressão de c-Fos em neurônios sintetizadores de OT e de VP na região magnoceular do hipotálamo e em neurônios sintetizadores de OT na região parvoceular do PVN, indicando a possibilidade de que alguma via inibitória central pode ser ativada, limitando a ingestão de salina hipertônica induzida por este tratamento (BLACKBURN et al., 1992a). Em estudo semelhante, observa-se também que ratos tratados com injeção subcutânea de polietilenoglicol (PEG), colóide hiperoncótico que promove sequestro das moléculas de água no LEC, que recebem microinjeção de OT i.c.v., apresentam inibição da ingestão de salina hipertônica e aumento da ingestão de água. Neste estudo também foi observado que a administração intraperitoneal de naloxona, antagonista dos receptores opioides do tipo  $\mu$ , inibe a ingestão de salina hipertônica e induz a síntese de ocitocina periférica e central (BLACKBURN et al., 1992b). Outros estudos mostram que ratos que recebem injeção subcutânea de PEG e microinjeção i.c.v. de OT não apresentam ingestão de salina hipertônica, além disso, observou-se também que injeções periféricas de salina hipertônica estimula a síntese de OT (STRICKER e VERBALIS, 1996; 2004). Em resumo, mecanismos endócrinos e



autônômicos são ativados diante da hipovolemia/ hiponatremia, por informações vindas de osmorreceptores, de receptores gustatórios e de receptores de volume e pressão, além da ativação do SRAA e sinais dos pós-ingestivos. Tais mecanismos são coordenados pelo SNC que dirige a busca e aquisição do sódio, conforme ilustrado na figura a seguir.

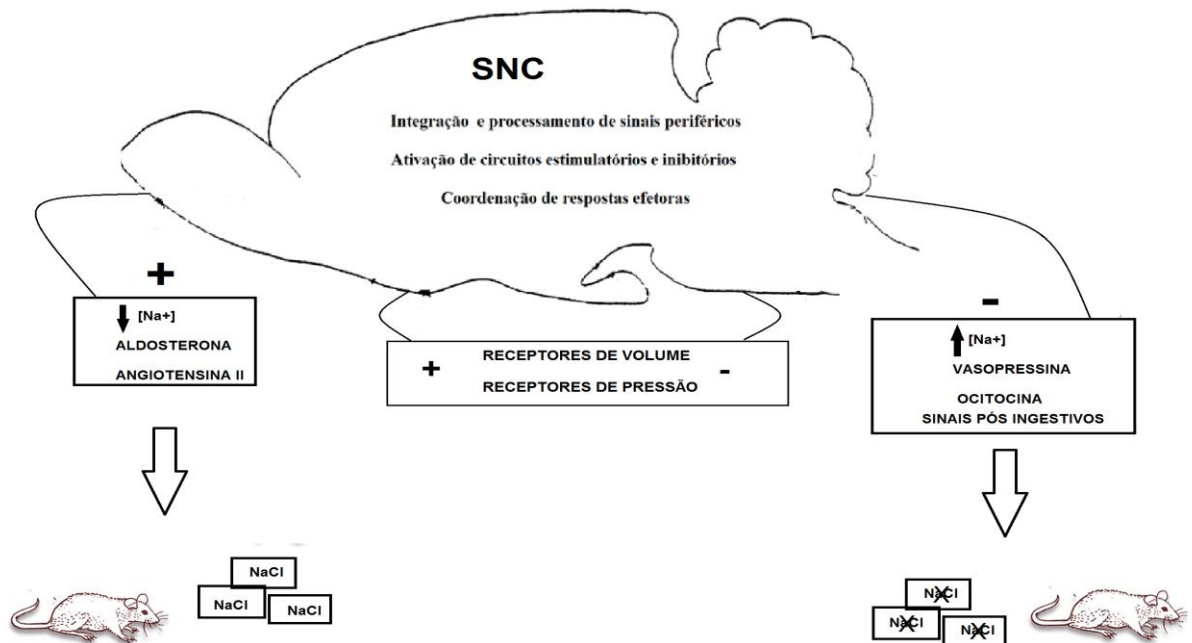


Figura. 1 Sinais estimulatórios e inibitórios para o apetite por sódio (desenho autoral).

## 2.5 ÁREAS ENCEFÁLICAS DO CIRCUITO DE CONTROLE DO APETITE POR SÓDIO

As informações a respeito dos parâmetros hidrossalinos são conduzidas por aferências nervosas e fatores circulantes ao SNC. As principais vias nervosas de acesso são os nervos vago (X) e glossofaríngeo (IX) que fazem sinapse com o NTS (NORGREN, 1983; GEERLING e LOEWY, 2008). A partir do NTS as informações são direcionadas a várias áreas centrais envolvidas com a regulação hidrossalina. Ao mesmo tempo, diversas substâncias circulantes associadas ao controle dos líquidos corporais acessam o SNC: as pequenas e lipofílicas atravessam a barreira hematoencefálica, as maiores passam por mecanismos específicos de transporte, enquanto muitas substâncias acessam por regiões onde a citoarquitetura da barreira hematoencefálica é diferenciada, uma vez que apresentam

capilares fenestrados que permitem a passagem de substâncias de elevado peso molecular do plasma para o parênquima cerebral, as áreas circunventriculares (CVOs) (MCKINLEY et al., 1992; JOHNSON e LOEWY, 1993; ENGELHARDT, 2003). No SNC, o controle do comportamento ingestivo é processado por áreas facilitatórias, predominantes no prosencéfalo, e por áreas inibitórias predominantes no romboencéfalo. As áreas límbicas, relacionadas com a motivação, o prazer e a recompensa, também integram a rede de regulação do apetite por sódio (FITZSIMONS, 1998; MCKINLEY et al., 1992; JOHNSON e THUNHORST, 1997; GEERLING e LOEWY, 2008).

A barreira hematoencefálica separa o parênquima encefálico e a corrente sanguínea, de modo que as únicas estruturas sem esta barreira são os plexos coróides e as regiões circunvizinhas localizadas ao longo da linha média do terceiro e quarto ventrículos. Os CVOs são: SFO, OVLT, eminência mediana, lobo intermediário da hipófise, neurohipófise, órgão subcomissural (SCO), glândula pineal (PT) e AP (JOHNSON e GROSS, 1993). O SFO, o OVLT e a AP são referidos como sensoriais, não apenas pelas citoarquitetura diferenciada que permite o acesso livre de substâncias pesadas e polares, mas por suas células estarem em contato direto com o sangue e o líquido cefalorraquidiano. A extensa vasculatura destas estruturas apresenta receptores para o ácido gama-aminobutírico (GABA), a serotonina, a renina, a ANGII, além de expressarem os canais  $Na_x$ , bem como a fácil acessibilidade a peptídeos regulatórios, como agrelina e a leptina, e mediadores da resposta imunológica como a IL-1 $\beta$  (JOHNSON e GROSS, 1993; DENTON et al., 1996; FITZSIMONS, 1998; WATANABE, 2000; MCKINLEY et al., 2001; SMITH e FERGUSON, 2010; GALEA et al., 2006). Outras áreas encefálicas participam da integração e arranjo das informações hidrossalinas, são elas: NTS, PBN, região ventrolateral do bulbo (RVLM), tálamo, PVN hipotalâmico, SON e MnPO, destas áreas, as informações são retransmitidas para áreas efetoras que geram e desencadeiam respostas organizadas (BOURQUE, 2008, SMITH e FERGUSON, 2010).

Os componentes que produzem o apetite específico por sódio são os referidos como facilitatórios e estão localizados ao longo da *lamina terminalis* (LT), na parede anterior do 3V, composta pelo SFO, o MnPO e o OVLT, que atua como uma unidade funcional integrada, de modo que seus neurônios constituem o substrato anatômico primário para percepção de variações osmóticas. Além disso, estas estruturas apresentam conexões recíprocas e também com outras áreas importantes na regulação cardiovascular, sendo que a

hipovolemia, a hiponatremia e a hipotensão ativam o sistema facilitatório. (FITZSIMONS, 1998; JOHNSON e THUNHORST, 1997; MCKINLEY et al., 1999; SMITHe FERGUSON, 2010).

Estudos mostram a responsividade da *lamina terminalis* a desafios osmóticos (ROWLAND et al., 1996; DE LUCA JR et al., 2002). Encéfalos de animais depletados de sódio, sem acesso a água destilada ou alimento rico em sódio por 24 horas, apresentam elevada expressão de c-Fos no SFO e no OVLT, enquanto animais depletados de sódio, que tiveram água destilada por 24 horas, receberam microinjeção i.c.v. de renina e após período de latência, apresentaram robusta ingestão de salina hipertônica e seus encéfalos mostraram elevada expressão de c-Fos no SFO, no MnPO e no OVLT (ROWLAND et al., 1996). Em outro estudo, observou-se que ratos desidratados por 24h, após duas horas de ingestão de água destilada, apresentaram robusta ingestão de salina hipertônica e os encéfalos com elevada expressão de c-Fos nas áreas da *lamina terminalis* e no SON (DE LUCA JR et al., 2002). A ingestão de água promovida por injeção subcutânea de PEG e microinjeção i.c.v. de ANGII também é associada a elevada expressão de c-Fos por toda LT e PVN. Contudo, os animais que receberam injeção periférica de losartana, antagonista dos receptores AT<sub>1</sub>, a sede e a ativação neuronal foram diminuídas, sendo a menor expressão de c-Fos no SFO. No mesmo estudo, animais depletados de sódio que receberam ANGII i.c.v., apresentaram elevada ingestão de salina hipertônica e expressão de c-Fos no MnPO e no SFO, enquanto os animais que receberam losartana apresentaram redução do apetite por sódio e da expressão de c-Fos, sendo quase inexpressivo no SFO (CREWS e ROWLAND, 2005). Animais submetidos à diálise peritoneal apresentam diminuição da concentração de sódio plasmático, e quando recebem salina hipertônica i.c.v., 24 horas depois, apresentam ingestão de salina hipertônica modesta quando comparado ao grupo que não recebeu salina hipertônica i.c.v. (CHIARAVIGLIO e PÉREZ GUAITA, 1986). Este dado sugere que receptores no SNC detectam variações de sódio intersticial e controlam o apetite por sódio.

Localizado acima do 3V, o SFO faz conexões e ferentes com áreas hipotalâmicas importantes na função autonômica envolvidas com a regulação cardiovascular, imunológica, função reprodutiva e homeostase energética tais como: PVN, arqueado, hipotálamo lateral, área perifornical (PFA) e SON (FERGUSON et al., 2010). Diversos estudos mostram a importância do SFO como área primária para percepção de variações na osmolaridade plasmática, portanto imprescindível para os comportamentos de sede e o apetite por sódio

(DENTON et al., 1996; GOLDIN et al., 2000; HIYAMA et al., 2004). Aumento da expressão de c-Fos é observado no SFO e no NTS após 24 horas da depleção de sódio e perdura por até 12 horas depois da ingestão de salina hipertônica, declinando ao longo deste período. Tais dados sugerem o SFO e o NTS podem ser marcadores temporais da depleção de sódio e região de entrada das informações sensoriais no SNC (HOUPY et al., 1998). Esta hipótese é confirmada em estudo onde ratos com lesão no SFO, desidratados por 24 horas ou que receberam injeção sistêmica de salina hipertônica apresentam ingestão normal de água, contudo, os ratos depletados de sódio apresentam diminuição da ingestão de salina hipertônica quando comparados ao grupo sem lesão do SFO (WEISINGER et al., 1990).

O MnPO integra parte da *lamina terminalis* e compreende a região localizada ao longo da parede rostral do 3V. Faz conexões eferentes com áreas hipotalâmicas envolvidas na regulação cardiovascular como o PVN, o SON, o LPB e o HLA (JOHNSON e LOEWY, 1993), além de ser indicado como área importante no ritmo circadiano e na termorregulação (MORRISON et al., 1998, CLAPHAN, 2011; MCKINLEY; 2015). A região ventral do MnPO junto com o OVLT, compõe a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) (JOHNSON e THUNHORST, 1997). O MnPO parece ser importante área integradora de sinais, responsivo às alterações osmóticas, de volume e de temperatura (MCKINLEY, 2004; MORRISON e NAKAMURA, 2011). Estudo eletrofisiológico mostra que neurônios do MnPO são responsivos às variações osmóticas e pelo processamento imunohistoquímico, foram identificados nestas células os canais  $Na_x$  (GROB et al., 2004). Desde que ratos depletados de sódio apresentam aumento da expressão do RNA para os receptores  $AT_1$  no SFO, no MnPO e na região parvocelular do PVN, tem sido sugerido que a deficiência de sódio induz plasticidade dos receptores  $AT_1$  em resposta a desafios hidrossalinos (CHARRON et al., 2002). A participação da ANGII no MnPO no controle da ingestão de sódio é corroborada por estudo com animais depletados de sódio que recebem injeção periférica de ANGII e apresentam robusto apetite por sódio em comparação aos animais que recebem microinjeção de losartana no MnPO (LUCA JR e FRANCIS, 2004). Verifica-se que ratos depletados de sódio e com lesão no MnPO apresentaram diminuição da ingestão de salina hipertônica quando comparados ao grupo com depleção simulada (*sham*) (DE LUCA JR e FRANCIS, 2004). Por outro lado, ratos com lesões simultâneas no SFO e no OVLT, mas com MnPO intacto, apresentam significativa diminuição da ingestão de água e salina hipertônica, mas não abolição do comportamento, sugerindo a modulação de outras áreas do SNC (MCKINLEY, 1999). Estudo mostra que ratos com lesão na AV3V, ao receberem sobrecarga

intragástrica de salina hipertônica, apresentaram redução na ingestão de água e de salina hipertônica, além da diminuição da expressão de c-Fos no PBN e no NTS (ROCHA et al., 1999). Ratos com lesão na AV3V e submetidos a dietas hipossódicas, apresentam diminuição da ingestão de sódio (BAELER e JOHNSON, 1979).

Estendendo-se através da parede rostral do 3V o OVLT é altamente vascularizado e suas células estão em contato direto com líquido cefalorraquidiano, o que faz desta área integrante do circuito primário de monitoramento da osmolaridade plasmática e regulação cardiovascular (JOHNSON e LOEWY, 1993; KINSMAN et al., 2016). Estudo eletrofisiológico com culturas de neurônios do OVLT mostra a responsividade destas células a diferentes concentrações de solução salina de modo que esta responsividade foi diretamente proporcional a concentração da solução salina. No mesmo estudo, microinjeções de salina hipertônica no OVLT induzem aumento da atividade simpática do nervo renal e da pressão arterial, e o pré-tratamento com muscimol, antagonista dos receptores GABA do tipo A (GABA<sub>A</sub>) atenua a resposta simpatoexcitatória e a pressora (KINSMAN et al., 2016). Observa-se também que ratos com lesão no OVLT, depletados de sódio ou privados de água apresentam diminuição do apetite por sódio ou da sede (JOHNSON e GROSS, 1993).

A amígdala estendida integra e modula função neural e hormonal relacionada ao apetite por sódio e a regulação cardiovascular, além de motivação e do hedonismo, do aprendizado, da memória, do medo, da ansiedade e da depressão. Vias neuronais recíprocas entre o complexo amigdalóide e a área tegmental ventral (VTA), região relacionada à síntese de dopamina e parecem ser importantes para o controle do comportamento de recompensa e deaversão (JOHNSON et al., 1999; WALKER e DAVIS, 2005; JENNINGS, 2013). A amígdala estendida é formada pelos núcleos central e medial (CeA e MeA, respectivamente) e os núcleos lateral e mediano do leito da estria terminal (BSTL e BSTM, respectivamente) (JOHNSON et al., 1999). O BSTL e a CeA apresentam conexões recíprocas e com áreas envolvidas na regulação cardiovascular e dos líquidos corporais, como os núcleos parabraquial lateral (LPBN) e PVN. O BNST e MeA recebem aferências da LT e informações viscerais do LPBN (JOHNSON et al., 1999; VEINANTE e FREUND-MERCIER, 1998). Além disso, a amígdala estendida apresenta receptores para diversos neurotransmissores e neuromodulares, como o GABA, a serotonina, os opioides, a dopamina, a histamina, a renina, a ANGII, a aldosterona e a IL-1 $\beta$  (GEERLING e LOEWY, 2008; CP LUZ et al., 2007; HORVITZ, 2001; ALMEIDA et al., 2015). Estudos mostram participação dos núcleos da

amígdala no controle do apetite por sódio. Observa-se em ratos depletados de sódio elevada expressão de c-Fos e RNAm do receptor opioide do tipo  $\mu$  ( $\mu$ -OR) no BNST, na CeA, na região da concha do núcleo accumbens (NAcb), no MnPO e no SFO (GRODIN et al., 2011). Tanto a CeA quanto a MeA parecem ser importantes para o controle do apetite por sódio. Estudos com lesão eletrolítica mostram redução da ingestão de salina hipertônica induzida por tratamento periférico de ANGII ou ALDO (ZHANG et al., 1993; ZARDETTO-SMITH et al., 1994). Receptores GABA, também presentes na CeA, parecem ser importantes para o controle do apetite por sódio. Observou-se que ratos depletados de sódio que recebem microinjeções de muscimol, agonista dos receptores GABA<sub>A</sub>, apresentam diminuição da ingestão de salina hipertônica, e o pré-tratamento com microinjeções de losartana na CeA, inviabiliza o efeito inibitório do muscimol. Neste estudo verifica-se também que apenas as microinjeções de losartana na CeA não modifica a ingestão de salina hipertônica, assim, este resultado sugere que a desativação de mecanismos facilitatórios por muscimol ocorre por mediação da ANGII (HU B et al., 2015).

O sistema mesocorticolímbico, o circuito da motivação e recompensa, que inclui: a VTA, o pálido ventral (VP) o Nacb, a CeA, a MeA, a amígdala basolateral (BLA), o hipotálamo lateral (HL) e o córtex pré-frontal (PFC). Tais áreas são importantes no controle da atividade motora, do aprendizado, da memória e dos comportamentos motivacionais e hedônicos, além de sistemas de neurotransmissores como opióides, dopamina e GABA (BERRIGDE, 1996; CARDINAL et al., 2002; FONTININI et al., 2009). A recompensa que pode ser definida como busca motivada por fontes que desencadeiam a sensação de bem estar e gratificação. O circuito cerebral da recompensa medeia o estado motivacional do “querer”, do “desejar” e os mecanismos hedônicos do “gostar” (CARDINAL et al., 2002; BERRIDGE, 2009). O prazer pode ser definido como sensação promovida pela associação do “querer”, do “gostar” e do “aprendizado”, o que inclui associação de experiências novas recompensatórias com experiências passadas (BERRIDGE, 1996; 2009). A salina hipertônica utilizada nas sessões experimentais que avalia, mensura e qualifica o apetite por sódio é altamente aversiva à animais normonatrêmicos, entretanto, diante da necessidade orgânica de sódio apresentada, a ingestão de salina hipertônica torna-se altamente palatável, assim, o apetite por sódio passa a ser um agente motivador (BERRIGDE e FLYNN, 1984; ROITMAN et al., 2002; NA et al., 2007; YAN et al., 2014). A informação do sabor salgado é transmitida a áreas cerebrais envolvidas com os comportamentos motivacionais, de modo que os circuitos neurais que detectam a necessidade orgânica de sódio e dirige o apetite por este íon, compartilham

componentes com circuitos associados com a motivação e a recompensa (JOHNSON e GROSS, 1993; DANIELS e FLUHARTY, 2004; KRAUSE e SAKAI, 2007). Estado hiponatrêmico persistente pode induzir sinais associados ao comportamento depressivo, bem como induzir plasticidade neuronal em áreas cerebrais envolvidas com a recompensa e sensibilização às drogas, como Nacb (GEERLING e LOEWY, 2008). Verifica-se que em ratos submetidos a repetidas depleções de sódio há alterações morfológicas nos dendritos da região da concha do Nacb, indicando plasticidade neuronal após os sucessivos desafios osmóticos, e maior sensibilidade ao apetite por sódio. Nesse estudo, a depleção de sódio promoveu aumento da sensibilidade a anfetamina, indicando as alterações neuronais comuns ao sal e sensibilização à drogas podem proporcionar um mecanismo geral para respostas comportamentais (ROITMAN et al., 2002). Em estudos semelhantes, ratos submetidos a uma depleção ou depleções repetidas de sódio apresentam robusta ingestão de salina hipertônica e elevada expressão de c-Fos no Nacb após finalização deste comportamento (VOORHIES e BERNSTEIN, 2006; NA et al., 2007). Outra área da circuitaria é o HL. Verifica-se que ratos com lesão nesta área apresentam adipsia e afagia e a ingestão de salina hipertônica induzida por DOCA é expressivamente reduzida. No mesmo estudo, a lesão no HL não alterou o apetite por sódio em animais com hiponatremia induzida por diálise intraperitoneal (WOLF, 1964). Estudo indica que o córtex parece necessário ao processo de aprendizagem, identificação e sensibilidade ao sabor salgado (BLONDE et al., 2014). Ratos com lesão no neocórtex ou córtex sensorial, depletados de sódio ou tratados com injeção intraperitoneal de DOCA apresentaram resposta natrioréxica esperada, contudo atrasada e atenuada, quando comparados com o grupo controle. Observou-se também neste estudo que os animais sem lesão no neocórtex ou córtex sensorial aprenderam em menor tempo a discriminar a solução de NaCl da solução de KCl e do leite (WOLF et al., 1970).

Enquanto as áreas prosencéfalicas apresentam-se facilitatórias para o apetite por sódio, as áreas posteriores pontinas atenuam este comportamento. As informações viscerais chegam ao SNC através de aferências vagais ao do núcleo do trato solitário (NTS). Também podem acessar pela área postrema (AP) através de fatores circulantes (JOHNSON e LOEWY, 1993; JOHNSON e THUNHORST, 1997; GEERLING e LOEWY, 2008). Outra região que integra a rede inibitória do apetite por sódio, é o núcleo parabraquial (PBN) que recebe aferências do NTS e AP, e envia para o MnPO, SFO e CeA (NOGREN, 1978; OHMAN e JOHNSON, 1986; MENANI et al., 2014). Consistente com estes dados, têm-se ingestão robusta de salina hipertônica e a elevada expressão de c-Fos em neurônios AP, região

mediana do NTS e PBN, apresentados por ratos hiponatrêmicos (FRANCHINI e VIVAS, 1999; GODINO et al., 2007).

A AP corresponde a uma estrutura bilateral, localizada sobre a superfície dorsal do bulbo, adjacente afossa rombóide e região caudal do quarto ventrículo (4V). Seu aporte sanguíneo chega das artérias cerebrais inferior e posterior, sendo esta uma possível via de acesso entre a AP e o NTS (JOHNSON e LOEWY, 1993; MILLER e LESLIE, 1994). Recebe aferências do nervo vago e dos núcleos hipotalâmicos paraventricular e dorsomedial (PVN e DMH, respectivamente) e projeta eferências para o NTS e LPBN (FITZSIMONS, 1998; MCKINLEY e JOHNSON, 2004; STRICKER e HOFFMANN, 2006). Além de envolvida no controle da homeostasia cardiovascular e hidrossalina, esta área é importante na monitorização e percepção química de toxinas eméticas circulantes, portanto está relacionada à geração do vômito (MILLER e LESLIE, 1994; FITZSIMONS, 1998). Diversos estudos mostram a função AP-NTS no apetite por sódio (CONTRERAS e STETSON, 1981; EDWARDS e RITTER, 1982; HYDE e MISELIS, 1984). Estudos mostram que lesão na AP promove espontânea ingestão de substâncias hipertônicas, contudo sua remoção não é crítica à vida (WATSON, 1985; JOHNSON e LOEWY, 1993; FITZSIMONS, 1998). Verifica-se que ratos normonatrêmicos com lesão na AP apresentam ingestão copiosa de salina hipertônica (CONTRERAS e STETSON, 1981). Em estudo semelhante, após lesão na AP, ratos apresentam excessiva ingestão de salina hipertônica, mas não apresentam natriurese, além dos níveis de aldosterona presente na urina semelhantes aos de animais sem lesão; apresentam também bradicardia e pressão sanguínea normal (KOSTEN et al., 1983). Verifica-se também que ratos com lesão na AP, tratados cronicamente com injeção intravenosa de losartana por 10 dias e mantidos com dieta hipersódica, não apresentam alterações na pressão sanguínea tampouco na ingestão de água, contudo há aumento da ingestão de salina hipertônica (OSBORN et al., 2000). Lesão AP e região caudal do NTS de ratos promovem polidipsia permanente, natriurese e ingestão copiosa de salina hipertônica, em resposta a privação hídrica de 24 horas (HYDE e MISELIS, 1984).

O PBN, estrutura pontina circunvizinha ao pedúnculo cerebelar superior, ou bráquio, está dividido em núcleo parabraquial mediano e lateral (MPBN e LPBN, respectivamente) (NOGREN, 1978). Diversos estudos evidenciaram que o circuito formado por NTS-AP-LPBN é inibitório para o apetite por sódio (MENANI et al., 1996; FITZSIMONS, 1998). A hipovolemia ativa o SRA, em contrapartida a hiperosmolaridade



plasmática ativa mecanismos antinatriorexigênicos no PBN (DE LUCA JR, 2003). O PBN funciona como região integradora importante com projeções às regiões prosencefálicas, exercendo atividade inibitória (MENANI et al., 2014). Dados da literatura mostram que microinjeção de muscimol no LPBN promove ingestão de salina hipertônica em ratos normonatrêmicos, sugerindo que o GABA promove uma desativação inespecífica ou geral da inibição associada ao LPBN (OLIVEIRA et al., 2007). Outros sistemas de neurotransmissores, como o hormônio liberador da corticotrofina (CRH) também parece exercer efeito inibitório no LPBN. Observa-se em ratos depletados de sódio que microinjeção no LPBN do antagonista do hormônio liberador da corticotrofina,  $\alpha$ -helic<sub>9-41</sub>(CRH<sub>9-41</sub>), estimula a ingestão de salina hipertônica, indicando que o CRH endógeno age limitando o apetite por sódio (DE CASTRO E SILVA et al., 2006).

Diversos estudos utilizam os conhecimentos e as ferramentas da eletrofisiologia, da biologia molecular e da anatomia para fornecer evidências da presença e da modulação de neurotransmissores e/ou neuromoduladores e dos seus receptores, localizados em áreas específicas do SNC, e as vias neuronais conectando tais áreas envolvidas com a regulação do apetite por sódio. Os principais neurotransmissores/ neuromoduladores são o GABA, o glutamato, a acetilcolina, a adrenalina, a histamina, os opioides, a dopamina, a serotonina, a angiotensina e a aldosterona, que são sintetizados e liberados em respostas a eventos periféricos, ativando mecanismos natriorexigênicos e/ou antinatriorexigênicos para manutenção da homeostasia hidrossalina. (FITZSIMONS, 1998; MARGATHO et al., 2002; ANDRADE et al., 2004; MAGRANI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; DE GOBBI et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2014). Neste estudo, investigamos se efeito da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA sobre o apetite por sódio de ratos depletados deste íon é dependente da integridade do sistema serotoninérgico central, uma vez que são pouquíssimos os estudos mostrando os efeitos desta citocina sobre este comportamento, além da possível mediação desse efeito por vias de neurotransmissão.

## 2.6 SISTEMA SEROTONINÉRGICO CENTRAL E APETITE POR SÓDIO

A indolamina 5-hidroxitriptamina (5-HT ou serotonina) atua em todo organismo, como neurotransmissor e/ou modulador e/ou hormônio e deriva da hidroxilação e

carboxilação do triptofano, aminoácido essencial obtido na dieta, cuja síntese ocorre por uma via metabólica curta de duas reações, mediada por ação da enzima triptofano hidroxilase (TpOH), existente nas isoformas tipo 1, encontrada nos tecidos, e tipo 2, encontrada apenas no citoplasma dos neurônios serotoninérgicos (TpOH<sub>1</sub> e TpOH<sub>2</sub>, respectivamente). A TpOH converte o L-triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que ao ser descarboxilado pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase, resulta em 5-HT. Após sintetizada, a 5-HT é armazenada em vesículas e diante de um estímulo, o neurônio serotoninérgico é despolarizado, ocorrendo a abertura dos canais de Ca<sup>+2</sup>, a entrada deste íon na célula e exocitose de com 5-HT. Tal processo é mediado por auto-receptores pré-sinápticos (MANSON et al., 1999).

A remoção da 5-HT na fenda sináptica é mediada pelo transportador de serotonina (SERT), proteína transmembrana específica dependente de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> presente nos neurônios serotoninérgicos (MANSON et al., 1999). Diversos fármacos são utilizados para o tratamento dos transtornos psiquiátricos como a depressão e ansiedade, bloqueando o transportador SERT, como os inibidores da receptação de serotonina (ISRS). Estas drogas ao se ligarem nos transportadores SERT inviabiliza que a 5-HT seja recaptada pelo neurônio pré-sináptico, consequentemente aumentando a concentração extracelular do neurotransmissor, potencializando sua ação no neurônio pós-sináptico. São exemplos desta classe de fármacos a fluoxetina, o citalopram e a sertralina (JONGHE e SWINKELS, 1997; LESCH, 2005). Outra via regulatória dos níveis de 5-HT na fenda sináptica é a sua degradação, catabolizada pela enzima monoamina oxidase tipo A (MAO<sub>A</sub>), localizada nas membranas mitocondrial e axonal dos neurônios serotoninérgicos pré-sináptico, promove desaminação oxidativa resultando em 5-hidroxiindolacetildeído (5-HIA), que ao ser oxidado pela enzima aldeído desidrogenase, resulta em ácido 5- hidroxiindolacético (5-HIAA), seu principal metabólito (AZMITIA, 1999; ZANG et al., 2004; VAN DONKELAAR et al., 2011).

A síntese de 5-HT parece ser limitada pela disponibilidade de triptofano no líquido. Estudo mostra que injeções de triptofano ou elevado consumo de carboidratos promove aumento dos níveis deste aminoácido e da 5-HT, todavia, quando o aumento de triptofano plasmático resulta da ingestão elevada de proteínas, os níveis de 5-HT não aumentam, supostamente devido a presença de outros aminoácidos neutros no plasma, como, a tirosina, a fenilalanina, a leucina, a isoleucina e a valina (FERNSTROM e WURTMAN, 1972). Dietas pobres deste aminoácido podem comprometer a síntese de 5-HT e ocasionar a depleção orgânica desta indolamina. Verifica-se que ratos submetidos a dieta livre de

triptofano por vinte e cinco dias, apresentam depleção sérica e encefálica da 5-HT e do 5-HIA, e após duas horas de acesso ao alimento com triptofano, houve aumento nos níveis séricos da 5-HT (BIGGIO et al., 1974).

Apenas 2% da 5-HT é encontrada difusamente no SNC e como esta indolamina não atravessa a BHE, é necessário o acesso do triptofano ao parênquima encefálico. Este processo envolve gasto energético e ocorre por carreadores protéicos não específicos que transportam outros aminoácidos neutros, como por exemplo, a valina, a fenilalanina e a tirosina (BLUNDELL, 1992). No SNC a 5-HT é sintetizada por neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, entretanto, não o único neurotransmissor / neuropeptídeo identificado nesta região, onde também são encontrados o GABA, o glutamato, a noradrenalina, a acetilcolina, a encefalina, a dopamina, a substância P e a neurotensina (AZMITIA, 1999). A rafe compreende de agrupamentos neuronais localizados na região médio-sagital ao longo da extensão rostro-caudal do tronco cerebral, ocupando uma área que se estende do mesencéfalo ao bulbo, com sete núcleos localizados na região da porção medial da formação reticular (B1-B9). Está subdividida em grupos superior e inferior, sendo os núcleos do grupo superior ou rostral: o caudal linear (CLN; B8), o dorsal da rafe (DRN; B6 e B7), o mediano da rafe (MRN; B8 e B5) e o supraleminiscal (SLN; B9), situados no mesencéfalo e na ponte. E os núcleos do grupo inferior ou caudal: o obscuro da rafe (NRO; B2), o pálido da rafe (NRPa; B1 e B4) e o magno da rafe (NRM; B3), situados no bulbo (JACOB e AZMITIA, 1992; AZMITIA e WHITAKER-AZMITIA, 1997; AZMITIA, 1999; HORNUNG, 2003). A maioria dos neurônios serotoninérgicos multipolares, partes dos grupamentos B1 e B3, estão localizados na região ventrolateral da medula (RVLM). A AP também apresenta neurônios serotoninérgicos, voltados ao 4V, supostamente envolvidos com a emese, além disso, estes neurônios projetam-se da AP para o hipotálamo e outras regiões prosencefálicas (MENANI, 1996; AZMITIA e WHITAKER-AZMITIA, 1997).

Os somas dos neurônios serotoninérgicos se encontram organizados ao longo da linha média dos núcleos da rafe e os seus axônios arborizam-se em grandes áreas compreendendo alvos diversos funcionalmente, formando vias complexas: são cinco vias para o prosencéfalo e três para a medula (LIDOV e MOLLIVER, 1982; AZMITIA e WHITAKER-AZMITIA, 1997). Neurônios serotoninérgicos do grupo superior se projetam para regiões prosencefálicas. O DNR apresenta conexões recíprocas com o córtex, o globo pálido (GP), o hipocampo, o hipotálamo, o tálamo, a amígdala estendida, o núcleo

supraquiasmático (SCN), a substância nigra, o NAcb, o núcleo habenular, a área septal, o corpo estriado, os CVOs e o plexo coroide (VERTES, 1991; JACOBS e AZMITIA, 1992; MICHELSEN, 2008). O MNR, por sua vez, também apresenta conexões recíprocas com o córtex, o hipocampo, o hipotálamo, o tálamo, a amígdala estendida, a área septal, o núcleo habenular, além da área pré-óptica (POM), a VTA, do corpo mamilar médio, do núcleo supramamilar, do núcleo posterior, da região perifornical do hipotálamo e da zona mediana incerta (AZMITIA e SEGAL, 1978; JACOBS e AZMITIA, 1992; VERTES et al., 1999). Os neurônios serotoninérgicos do grupo inferior enviam suas projeções para o tronco encefálico, por três projeções paralelas às colunas dorsal, intermediária e ventral da medula (JACOBS e AZMITIA, 1992; HORNUNG, 2003). A 5-HT encefálica medeia importantes mecanismos regulatórios de controle central, como a homeostasia cardiovascular e respiratória, o comportamento ingestivo, o comportamento sexual, a temperatura corporal, a resposta ao estresse, a nocicepção, o ritmo circadiano, a liberação de neurotransmissores, a neuroplasticidade, as funções cognitivas, a locomoção, a motivação e a recompensa, o abuso de drogas e a adicção, o comportamento social, além de estar associada ao surgimento de psicopatias de elevada prevalência clínica como os transtornos de ansiedade e compulsivo e a depressão (CASTRO E SILVA et al., 1997; MORIN, 1999; EDDAHIBI et al., 2001; MENANI et al., 2002; FERREIRA et al., 2005; CP LUZ et al., 2006; LACASSE e LEO, 2006; MAGALHÃES et al., 2010; MENESES e MARIN et al., 2012., GASBARRI, 2016). Assim sendo, o interesse em estudar o sistema serotoninérgico central mobiliza ferramentas da neuroquímica, da eletrofisiologia e da genômica com o objetivo de entender a miríade de mecanismos em que este neurotransmissor está envolvido (BEST et al., 2010).

A 5-HT desempenha sua função, estimulatória ou inibitória, interagindo com seus diferentes tipos de receptores (5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>) classificados segundo critérios farmacológicos e moleculares que consideram a sequência de aminoácidos que os codificam, os mecanismos de transdução de sinalização intracelular. São 14 subtipos de receptores 5-HT (5-HTR), sendo cinco subtipos dos receptores 5-HT<sub>1</sub>: 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>1D</sub>, 5HT<sub>1E</sub>, e 5HT<sub>1F</sub>; três subtipos dos receptores 5HT<sub>2</sub>: 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2B</sub>, e 5HT<sub>2C</sub>; dois subtipos dos receptores 5-HT<sub>5</sub>: 5HT<sub>5A</sub> e 5HT<sub>5B</sub> (HOYER et et al., 1994., KOHEN et al., 1996). Todos os 5-HTR são do tipo metabotrópico, logo a sinalização intracelular se processa de maneira lenta, uma vez que estão acoplados a proteínas G e assim sendo, para que ocorra a transdução de sinal, faz-se necessário a formação de um segundo mensageiro. A exceção dos demais, o receptor 5-HT<sub>3</sub> é único receptor ionotrópico regulado por ligante, portanto sua ação é mais rápida e apresenta

permeabilidade seletiva a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (PEROUTKA e HOWELL, 1994; THOMPSON e LUMMIS, 2006; MCCORVY e ROTH, 2015). Os 5-HTR são encontrados tanto no SNC quanto na periferia, mediando diversas funções e, diante da amplitude da distribuição destes receptores, compreende-se a participação deste neurotransmissor /neuromodulador/ hormônio em diversos mecanismos fisiológicos.

Diversos estudos mostram a participação da 5-HT e das vias serotoninérgicas na regulação da homeostasia hidrossalina, sobretudo sua participação nos mecanismos inibitórios do apetite por sódio (REIS, 1994; FITZSIMONS, 1998). Algumas áreas prosencefálicas envolvidas no controle do apetite por sódio recebem projeções eferentes de neurônios serotoninérgicos do DRN, são elas: SFO, OVLT, MnPO, PVN, SON e HL, e estas áreas prosencefálicas também enviam projeções para MRN (MARCINKIEWICZ et al., 1989; TANAKA, 1998; AZMITIA, 2001; CELEADA, 2001). Diversos estudos mostram que após injeções periféricas ou nos ventrículos encefálicos (VL ou 3V) com agonistas ou antagonistas dos receptores da serotonina exercem ação modulatória sobre a sede e o apetite por sódio (ROUAH-ROSILIO et al., 1992; BADAUÊ-PASSOS JR et al., 2003; CASTRO et al., 2000; 2001; 2002; 2003). Alguns estudos sugerem que a serotonina e suas vias exercem tônus inibitório sobre o controle do apetite por sódio (MENANI et al., 1996; 2000; 2014). Observa-se que ratos normonatremicos ou depletados sódio tratados com antagonista inespecífico dos 5-HTR, dexfenfluramina, amplamente utilizado na prática clínica como anorexigênico, diminui a ingestão de salina hipertônica e a ingestão espontânea de alimento hipersódico. Por outro lado, o tratamento com metergolina, antagonista inespecífico dos 5-HTR, aumenta a ingestão de salina hipertônica e a ingestão espontânea de alimento hipersódico, respectivamente (ROUAH-ROSILIO et al., 1992).

Uma das técnicas utilizadas para estudar a mediação do sistema serotoninérgico central nas diversas funções, cognitivas ou homeostáticas, em que a 5-HT está envolvida é a depleção, encefálica ou orgânica, desta indolamina com o uso do fármaco paraclorofenilalanina (p-CPA), bem como a lesão do DNR (MAZER et al., 1997; LIMA et al., 2004; REIS et al., 2007). Observa-se que a depleção encefálica de 5-HT ou lesão do DNR aumentam o apetite por sódio, tanto em ratos normonatremicos quanto depletados de sódio, sugerindo que a supressão das vias serotoninérgicas ascendentes do DNR podem alterar os mecanismos angiotensinérgicos envolvidos na regulação do apetite por sódio, bem como a atividade dos sensores de sódio presentes no SFO (REIS, 2007). Corroborando este dado,

estudos mostram a interação das vias angiotensinérgicas e serotoninérgicas no controle do apetite por sódio. Neurônios angiotensinérgicos do SFO projetam-se para DNR, de modo que variações nos níveis de ANGII são monitorados por neurônios sensíveis do SFO e transmitem esta informação para o DNR, assim, diante de uma hipovolemia, neurônios serotoninérgicos que se projetam para SFO apresentam aumento da atividade elétrica (TANAKA et al., 1998; 2001), além disso, verifica-se em ratos normonatrêmicos que após tratamento com ANGII há diminuição dos níveis de plasmáticos de 5-HT e seu metabólito, o ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) (TANAKA et al., 2003); observa-se também que ratos depletados de sódio há diminuição dos níveis de 5-HT e 5-HIAA no SFO, sugerindo que a serotonina nesta área pode participar do controle da sede e do apetite por sódio induzidos por ANGII (TAKAHASHI e TANAKA, 2016).

Estudos do laboratório de Neurociências (ICS/UFBA) contribuíram de maneira representativa à literatura sobre o envolvimento do sistema serotoninérgico central no controle da homeostasia hidrossalina, de início com injeções no 3V, investigando a possível participação dos diferentes tipos de receptores da serotonina nas áreas periventriculares, e posteriormente em áreas específicas do encéfalo (DE CASTRO E SILVA et al., 1996., CASTRO et al., 2000; 2001; 2002; 2003., CP LUZ et al., 2006; 2007). Nesses estudos, verifica-se que ratos submetidos a três distintos protocolos indução da sede, a privação hídrica por 14h, ou a injeções i.c.v. de ANGII ou do agonista colinérgico carbacol, quando tratados com injeção i.c.v. de L-694,247, agonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1D</sub>, há inibição ou ausência da ingestão de água e o pré-tratamento com i.c.v. de GR 127935, antagonista receptores do tipo 5-HT<sub>1D</sub>, não inibe ou anula a sede. Em animais normoidratados o tratamento com L-694, 247 não promove alterações na ingestão de água (DE CASTRO E SILVA et al., 1996). Observa-se também que ratos normoidratados, com sede induzida por injeções i.c.v. de ANGII ou carbacol, ao receberem i.c.v. de GR 113808 ou SB 204070, antagonistas dos receptores 5-HT<sub>4</sub>, apresentam aumento ingestão de água quando tratados com ANGII e diminuição da ingestão de água quando a sede é induzida por estimulação colinérgica, sugerindo papel inibitório da serotonina quando a sede é estimulada por ANGII e facilitatório quando estimulada por carbacol (CASTRO et al., 2000).

Ainda investigando os mecanismos serotoninérgicos sobre a sede, verificou-se que ratos com desidratação extracelular, induzida por sobrecarga orogástrica de salina hipertônica, ou hipovolemia, induzida por injeção subcutânea de polietilenoglicol (PEG), ao

receberem injeções i.c.v. de GR 113808 apresentam inibição da ingestão de água quando desidratados e estimulação da ingestão quando hipovolêmicos (CASTRO et al., 2001). Em outro estudo, ratos com desidratação extracelular ou com desidratação intracelular, induzida por privação hídrica, ou hipovolêmicos, tratados com i.c.v. de meta-clorofenilbiguanida (m-CPBG), agonista seletivo dos receptores de 5-HT<sub>3</sub>, apresentam inibição da ingestão de água, porém, quando pré-tratados com LY-278584, antagonista seletivo 5-HT<sub>3</sub>, não há inibição da sede. Ainda se verifica neste estudo que o m-CPBG também inibe a sede induzida por ANGII e por carbacol, sugerindo ação inibitória da serotonina, via receptores 5-HT<sub>3</sub>, sobre a ingestão hídrica (CASTRO et al., 2002).

Circuitos neurais envolvidos no controle da sede podem ser compartilhados no controle do apetite por sódio, de modo que ao estimular ou inibir a sede podem estimular ou inibir o apetite por sódio (JOHNSON e THUNHORST, 1997). Há, porém circuitos que estimulam ou inibem a ingestão de água sem qualquer alteração na busca e na aquisição do sódio (STRICKER e SVED, 2000). Diante dos dados obtidos com a sede, buscou-se investigar o envolvimento das vias serotoninérgicas centrais no controle do apetite por sódio. Verifica-se então que ratos depletados de sódio, tratados com injeção i.c.v. mCPP, apresentam diminuição da ingestão de salina hipertônica e o pré-tratamento com o antagonista dos receptores 5-HT<sub>2B,C</sub>, o SDZ-SER 082, inviabiliza o efeito antinatriorexigênico do mCPP. No mesmo estudo, a injeção i.c.v. de m-CPBG, promove redução expressiva da ingestão de salina hipertônica, e o pré-tratamento como LY-278 584, antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub>, bloqueou a inibição promovida pelo m-CPBG (CASTRO et al., 2003). Em estudos posteriores, investigou-se a participação da serotonina e seus receptores na CeA e na MeA, no controle do apetite por sódio, onde verificou-se que microinjeções de m-CPBG na CeA ou na MeA levam ao bloqueio do apetite por sódio e o pré-tratamento com ondansetrona, antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub>, inviabiliza o efeito antinatriorexigênico do m-CPBG em ratos depletados de sódio. Observa-se que microinjeção de m-CPP ou SDZ-SER 082 na CeA, não modifica a ingestão de salina hipertônica. Por outro lado, a microinjeção de SDZ-SER 082 na MeA promove diminuição da ingestão de salina hipertônica em ratos depletados de sódio. Estes resultados confirmam o papel inibitório dos receptores 5-HT<sub>3</sub> na CeA e na MeA sobre o apetite por sódio, enquanto os receptores 5-HT<sub>2C</sub> na MeA parecem ter efeito estimulatório (CP LUZ et al., 2006; 2007).

## 2.7 INDUÇÃO E FACILITAÇÃO EXPERIMENTAL DO APETITE POR SÓDIO

Sistemas hormonais coevoluíram com sistemas neurais para, em sinergia, controlar de forma organizada os comportamentos da sede e do apetite de sódio, essenciais às correções das flutuações na homeostasia hidrossalina. Tais sistemas respondem a estímulos combinados de LIC e LEC (STACHENFELD, 2008; MECAWI et al., 2015). A maioria dos desafios hidrossalinos que incitam o apetite por sódio envolve a ativação do SRA encefálico e levam horas ou dias para produzir um estado neural, endócrino e comportamental associado ao apetite por sódio (ROWLAND e MORIAN, 1999; CHARRON et al., 2002; GEERLING e LOEWY, 2008). Diante da escassez orgânica de sódio, os indivíduos se mobilizam a encontrar e consumir substâncias repletas deste íon. Nos laboratórios de pesquisa, os animais consomem soluções salinas usualmente hipertônicas e desagradáveis ao paladar, com concentrações variando de 1,5 a 3% de NaCl, durante um período específico, em resposta a perda orgânica de sódio (ROWLAND e MORIAN, 1999; ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; GEERLING e LOEWY; 2008). Assim, referem-se usualmente ao apetite por sódio como ingestão livre de soluções hipertônicas aversivas.

Os primeiros estudos para investigar este comportamento foram realizados por Ritcher, usando animais adrenalectomizados (RITCHER, 1936; 1939). Em sua pesquisa foi possível verificar a importância da ALDO na conservação orgânica de sódio. Evidenciando tal importância, muitos estudos injetam ALDO ou DOCA de forma sistêmica ou direta no SNC, para induzir a busca e a aquisição de soluções hipertônicas (DE LUCA JR et al., 1992; LANE et al., 1997; GEERLING et al., 2006; BYKOWSKI et al., 2007; YANG e MA, 2008). Outro meio para indução experimental do apetite por sódio é o tratamento com ANGII. Alguns protocolos utilizam da ANGII associado a mineralocorticóides potencializando o comportamento do apetite por sódio (FITZSIMONS, 1998; MCKINLEY et al., 2003; 2014; THORNTON et al., 2007; GEERLING e LOEWY, 2008). Segundo a hipótese da sinergia, ANGII e ALDO agem juntos dirigindo copiosa ingestão de solução salina hipertônica (AVRITH e FITSIMONS, 1979; DANIELS e FLUHARTY, 2004; MORRIS et al., 2008; GEERLING e LOEWY, 2008).

Os protocolos experimentais para os desafios hidrossalinos são frequentemente realizados com fármacos utilizados na prática clínica para tratamento da hipertensão. A



furosemida é um potente diurético que age sobre o co-transportador de  $\text{Na}^+/2\text{Cl}^-/\text{K}^+$  localizados na membrana luminal das células epiteliais, do ramo ascendente espesso da alça de Henle, produzindo excreção de água, de  $\text{Na}^+$ , de  $\text{Cl}^-$  e de  $\text{K}^+$  pela urina. Além de promover um estado de hipovolemia e de hiponatremia, há ativação de mecanismos de conservação do sódio, como o SRAA e o aumento dos níveis plasmáticos de renina, ANGI, ANGII e ALDO são perceptíveis aos CVOs (ROWLAND e MORIAN, 1999; GEERLING et al., 2006; MCKINLEY et al., 2014; KLOET et al., 2010). A utilização de diuréticos nos protocolos experimentais induz a rápida natriurese poucos minutos após a administração do fármaco. Há o acompanhamento contínuo da expressiva diurese, a fim de evitar que os animais tenham contato com urina excretada. Esses fármacos associados à dieta hipossódica resultam em uma condição endócrina e neural que dirige e motiva o animal a buscar e adquirir solução salina hipertônica (ROWLAND, 2007).

No presente estudo, o apetite por sódio foi induzido por injeção subcutânea de furosemida. A depleção de sódio durou em média quatro horas e as caixas forradas com papel absorvente foram constantemente trocadas, para evitar que os ratos lambessem a urina excretada. Após quatro horas do tratamento com furosemida, os ratos foram transferidos para as caixas individuais com maravalha limpa, com alimento hipossódico (fubá) e água destilada disponíveis por 24 horas, até o início das sessões experimentais. Neste período, os animais consomem água, restabelecendo o volume líquido perdido, mas não restabelecem o sódio, conseqüentemente, mecanismos para conservação do sódio e sinais facilitadores são ativados, criando um estado fisiológico que os dirige o apetite por sódio (JOLOWIEC, 1974). Por estes motivos utilizamos este método para induzir a hiponatremia que desencadeia o comportamento do apetite por sódio.

Dados da literatura mostram o uso da furosemida em associação ao captopril, inibidor da ECA (modelo FURO/CAP). Este protocolo traz como vantagem o curto período de tempo (aproximadamente 3 horas) para indução do comportamento de apetite por sódio, visto que ao inibir a formação de ANGII periférica, induz a formação rápida de ANGII central. Observa-se que injeções crônicas de furosemida associada ao captopril, separadas por uma semana de intervalo, aumentam a ingestão de sódio regulatória e a não regulatória (diária) e esse consumo foi suprimido quando os ratos receberam pré-tratamento de losartana, confirmando a participação da ANGII no apetite por sódio (PEREIRA et al., 2010). Muitos estudos mostram a depleção de sódio por diálise peritoneal, um modelo estabelecido de

desidratação extracelular que promove a diminuição na concentração de sódio plasmático em um período curto (aproximadamente 4 horas). Consiste em introduzir solução osmoticamente ativa (solução de glicose) por via intraperitoneal, em volume equivalente a 10% do peso corporal do animal. O peritônio funciona como membrana semipermeável, de modo que os eletrólitos movem-se em favor do gradiente de concentração (CHIARAVIGLIO e GUAITA, 1986; VIVAS et al., 1995; FRANCHINI et al., 2002). A depleção de sódio, seja por uso furosemida, ou da furosemina associada ao captopril, ou por diálise peritoneal, ativa áreas da circuitaria neural de controle do apetite por sódio como o OVLT, o MnPO, o SFO, a AV3V, a MeA, a CeA, a BLA, o BNST, o Nacb, o SON, o PVN, o LPBN, a AP e o NTS (VIVAS et al., 1995; LANE et al., 1997; PASTUSKOVAS e VIVAS, 1997; HOUPY et al., 1997; THUNHORST et al., 1998; FRANCHINI et al., 1999; 2002.; JI et al., 2005; CREWS e ROWLAND, 2005; NA et al., 2007).

O modelo de privação hídrica e reidratação parcial (PHRP) permite estudar separadamente os comportamentos de sede e o apetite por sódio. Oferta-se as buretas graduadas com água e após os animais saciarem a sede, oferta-se as buretas graduadas com salina hipertônica, para iniciar a ingestão de salina hipertônica, assim sendo é possível a identificação das áreas encefálicas envolvidas em cada comportamento. Tal protocolo consiste em privar os animais de água por 24 a 36 horas, promovendo um estado hipovolemia. Nesta condição há ativação do SRAA e aumento da osmolaridade plasmática. No período de reidratação parcial (teste da sede), os animais têm acesso a água por 2 horas, o que possibilita a correção parcial da hipovolemia e a diluição do LEC e após a reidratação parcial, os animais passam a ter acesso também a solução salina hipertônica (teste do apetite por sódio). A ingestão de salina hipertônica corrige totalmente o volume do LEC e a osmolaridade (DE LUCA JR et al., 2002a; 2002b.; 2010.; VENDRAMINI et al., 2009). Observa-se que ratos privados de água, por 24 a 30 horas, apresentam expressão de c-Fos no OVLT, SFO, MnPO e SON. Após reidratação por duas horas, sem a ingestão de salina hipertônica, a expressão de c-Fos permanece inalterada no SFO, é reduzida a metade no OVLT e no MnPO e ausente no SON (DE LUCA JR et al., 2002a).

Hormônios envolvidos na respostas ao estresse também podem induzir o apetite por sódio. Observa-se que ratos normonatremicos tratados com injeções subcutâneas de ACTH sintético por 5 dias apresentam aumento diário da ingestão da solução hipertônica de NaCl, em detrimento da ingestão das soluções de cloreto de potássio (KCl), de cloreto de

magnésio ( $MgCl_2$ ) e de cálcio ( $CaCl_2$ ) e a adrenalectomia não altera a resposta ao tratamento com ACTH (WEISINGER et al., 1978). Em estudo semelhante, camundongos normonatremicos tratados com injeção intraperitoneal de ACTH por 7 dias apresentam aumento da ingestão livre de sódio, mas quando o ACTH foi injetado i.c.v., não se observa o aumento no consumo livre de sódio. Ainda este estudo verifica-se que injeção intraperitoneal do CRH não induz aumento da ingestão livre de sódio, mas quando os camundongos recebem injeção i.c.v. de CRH, manifestam o comportamento (DENTON et al., 1999). Utiliza-se também a ioimbina, antagonista seletivo dos adrenoreceptores tipo alfa 2 ( $R-\alpha_2$ ), para induzir o apetite por sódio. Verifica-se que injeção subcutânea de ioimbina em ratos normonatremicos induz a ingestão de salina hipertônica (ZARDETTO-SMITH et al., 1991;1994).

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

1. Investigar os efeitos da IL-1 $\beta$  na Amígdala central (CeA) e na Amígdala medial (MeA) sobre o apetite por sódio.
2. Verificar a necessidade do sistema serotoninérgico central na resposta induzida pela IL-1 $\beta$ .
3. Verificar o efeito da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA sobre a temperatura corporal.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar os efeitos da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA sobre o apetite por sódio de ratos depletados deste íon.
- Investigar os efeitos da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA na atividade locomotora de animais depletados de sódio.
- Investigar os efeitos da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA na resposta hedônica à ingestão de substância palatável.
- Observar o efeito da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA sobre a temperatura corporal de ratos depletados de sódio.
- Verificar se o efeito da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA sobre o apetite por sódio de ratos depletados deste íon depende da integridade do sistema serotoninérgico central.

## 4 HIPÓTESES

### Hipótese geral:

**Hipótese nula ( $H_0$ ):** Se a ação da IL-1 $\beta$ , na CeA e na MeA, **não modifica** a ingestão de salina hipertônica em ratos com depletação de sódio, então a IL-1 $\beta$  **não participa** da regulação central do apetite por sódio.

**Hipótese teste ( $H_1$ ):** Se a ação da IL-1 $\beta$ , na CeA e na MeA, **modifica** a ingestão de salina hipertônica em ratos com depletados de sódio, então a IL-1 $\beta$  **participa** da regulação central do apetite por sódio.

### Hipóteses específicas

1. A possível ativação dos receptores IL-1R pela administração direta de IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA inibe o apetite específico por sódio.
2. A inibição do apetite por sódio, induzido pela IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA não decorre de alterações locomotoras.
3. A inibição do apetite por sódio induzido pela IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA não é devido a inibição inespecífica do comportamento ingestivo.
4. A possível ativação dos receptores IL-1R pela administração direta de IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA promove hipertermia em ratos depletados de sódio.
5. A inibição do apetite por sódio induzido pela IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA depende da integridade do sistema serotoninérgico central.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

No presente estudo, foram utilizados *Rattus norvegicus*, cepa Wistar, com 12 semanas de vida pesando  $250 \pm 20$ g, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA). Os animais foram mantidos em sala climatizada com temperatura de  $22 \pm 2$  °C e luz controlada com período de claro/escuro de 12 horas (7h às 19h), com ração balanceada (Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, Brasil), água destilada e solução salina hipertônica (1,5%) *ad libitum*. O número de animais utilizados nos experimentos foi previamente calculado, utilizando o programa estatístico BioEstat versão 5.0, poder do teste em 90% e  $p < 0,05$ . O tamanho ideal da amostra de 10 a 12 animais por grupo, para os protocolos de apetite por sódio. Os protocolos experimentais estão de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e *National Institutes of Health* (NIH/USA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da instituição (CEUA-ICS-UFBA: 056/2014).

### 5.2 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 na CeA ou na MeA. Para canulação da CeA, utilizou-se cânula de 15 mm, seguindo as coordenadas estereotáxicas: anteroposterior = 2,0 mm posterior ao bregma, lateral = 4,2 mm e vertical = 7,0 mm a partir da calota craniana. Para canulação da MeA utilizou-se cânula de 15 mm, com anteroposterior = 2,0 mm, lateral = 3,6 e vertical = 7,6 mm. Para os grupos submetidos à depleção encefálica de serotonina, canulou-se, além da CeA ou da MeA, também o ventrículo lateral (VL) e para isso, utilizou-se de cânula de 12mm, com anteroposterior = 0,5 mm, lateral = +/- 1,4 mm e vertical = 3,4mm. As pontas das cânulas guia foram posicionadas 1 mm acima das áreas pretendidas e as coordenadas foram baseadas em *The Rat Brain Atlas* (WATSON e

PAXINOS, 2009). As cânulas utilizadas na cirurgia central foram confeccionadas com agulhas hipodérmicas de aço inoxidável, com diâmetro de 0,7 mm, fixadas no crânio com acrílico dentário auto-polimerizante. Após este procedimento, as cânulas foram ocluídas com mandris removíveis confeccionados com fio de aço inoxidável, que foram trocados diariamente como medida preventiva para a obstrução das cânulas, como também habituar os animais as microinjeções centrais.

Ao final da cirurgia os animais receberam doses profiláticas de pentabiótico veterinário Fort-Dogde (Penicilina G procaína com Lecitina, estéril; penicilina G potássica estéril, sem Lecitina; Benzilpenicilina potássica; Citrato trissódico anidro estéril; Penicilina G benzatina com Lecitina, estéril; Estreptomicina estéril (base) Diidroestreptomicina estéril (base), na dose de 0,2 ml/Kg, e anti-inflamatório e analgésico Banamine (flunixin meglumina) e na dose de 0,1 ml/100g, ambos por via intramuscular. Ao acordarem da cirurgia, os animais foram alojados em caixas plásticas individuais e foram manipulados diariamente durante o período de recuperação cirúrgica, em uma simulação das condições experimentais aos quais foram submetidos, a fim de reduzir o estresse e monitorar as condições de saúde e bem estar. As caixas, os mandris, os bebedouros de água destilada e salina hipertônica (1,5%) ou água filtrada, foram trocados diariamente. No quinto dia foram realizadas as sessões experimentais.

### 5.3 DROGAS E MICROINJEÇÕES

Para depleção de sódio foi utilizado o diurético de alça furosemida (Lasix; Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil), na dose de 20 mg/rato, por injeção subcutânea.

Interleucina-1 $\beta$  (Rh IL-1 $\beta$ , recombinante humana – derivada de *Escherichia coli*; SIGMA CO., St. Louis, MO, EUA) utilizada nas concentrações de 0,1, 0,4, 0,8 e 1,6 ng. Solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) foi utilizada como veículo. As microinjeções centrais foram efetuadas através de uma seringa de 5 $\mu$ l (Hamilton, Co. Inc. Whittier, C.A.) conectada a uma agulha odontológica nº 30G com 16 mm através de um tubo de polietileno (PE10) na CeA ou na MeA. O volume total injetado foi de 0,2  $\mu$ l durante aproximadamente sessenta segundos para cada cânula. Os grupos controle receberam microinjeções de solução salina isotônica no mesmo volume. Após as microinjeções da droga, foi esperado um tempo extra de um minuto a fim de viabilizar a difusão da droga no parênquima encefálico.

Para-clorofenilalanina metil ester (p-CPA, SIGMA CO., St. Louis, MO, EUA), na concentração de 200 µg/2 µl. Solução fisiológica (NaCl 0,9%) como veículo. As microinjeções centrais foram efetuadas através de uma seringa de 10 µl (Hamilton, Co. Inc. Whittier, C.A.) conectada a uma agulha odontológica nº 30G com 13 mm de comprimento, através de um tubo de polietileno (PE10) no VL. O volume total injetado foi de 2 µl durante aproximadamente sessenta segundos. O grupo controle recebeu microinjeção de solução salina isotônica no mesmo volume. A concentração de p-CPA utilizada no presente estudo está de acordo com sugerido na literatura (REIS et al., 1994; HRITCU et al., 2007).

#### 5.4 HISTOLOGIA

Após as sessões experimentais os animais foram anestesiados com cetamina-xilazina (80-7mg/kg; i.p.) e receberam microinjeções do corante azul de Evans (2%) com volume de 0,1µl. Após cinco minutos, os animais foram submetidos a perfusão transcardíaca com solução salina isotônica seguida por formol a 10%. Os encéfalos foram removidos e fixados em solução formol 10%, refrigerados a 4°C por 24 horas. Após este período os encéfalos foram transferidos para solução de formol glicosado a 30%, onde ficaram estocados e refrigerados, a 4°C por 48 horas, para crioproteção antes do processamento histológico. Após este período, os encéfalos foram cortados por técnica de congelamento no criostato (35µM), 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. Aos grupos que receberam injeções de IL-1β apenas os dados referentes aos ratos cujo as cânulas estavam na CeA ou MeA foram utilizados. Nos grupos que receberam injeção i.c.v de p-CPA, foram considerados na análise apenas os dados cujo as cânulas estavam na CeA e VL ou MeA e VL.



## 6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

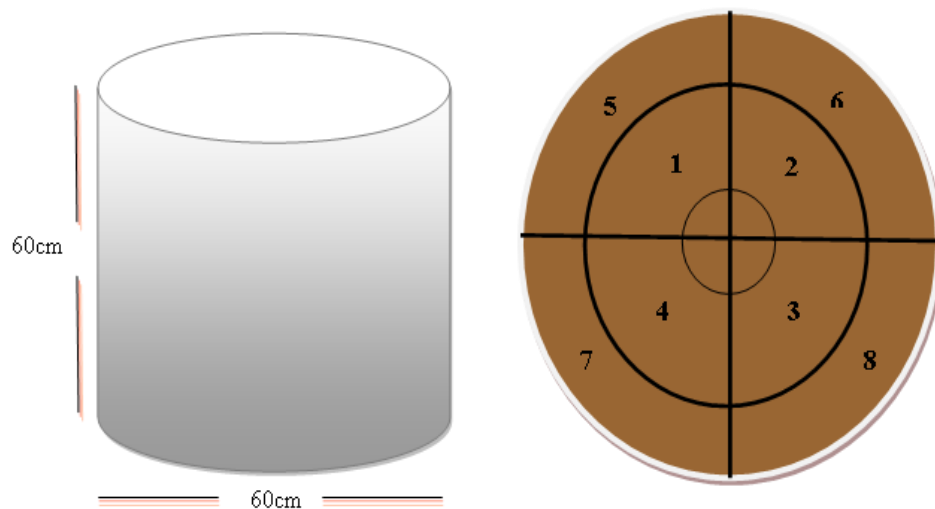
### 6.1 DEPLEÇÃO ORGÂNICA DE SÓDIO

Após quatro dias de habituação as sessões experimentais, a ração e os bebedouros graduados de água destilada e de solução salina hipertônica (1,5%) foram removidos para dar início a depleção de sódio. Para induzir a depleção, os animais receberam injeção s.c de furosemida na dose de 20 mg/rato ou solução fisiológica estéril (grupo normonatrêmico, sem depleção). A diurese foi monitorada por observação e as caixas trocadas constantemente, a medida que ficavam molhadas. Quatro horas depois, os animais foram transferidos para uma caixa com maravalha e mantidos em dieta hipossódica (0,001 % Na<sup>+</sup>e 0,33 % K<sup>+</sup>) e água destilada por 24 horas. No dia seguinte, foi realizada as sessões experimentais, onde os animais depletados de sódio foram divididos em cinco grupos distintos: três grupos de IL-1 $\beta$ , onde cada concentração utilizada representa um grupo, o grupo controle e o grupo normonatrêmico. Os animais receberam microinjeções bilateral de IL-1 $\beta$  na CeA ou MeA nas seguintes concentrações: 0,4, 0,8 e 1,6 ng/0,2  $\mu$ l ou solução fisiológica estéril para os grupos controle depletado e normonatrêmico. Apenas um grupo de animais com implante de cânula na CeA recebeu microinjeção de concentração de 0,1 ng/ 0,2  $\mu$ l. 15 minutos após as microinjeções, os bebedouros graduados de água destilada e de solução salina hipertônica foram oferecidos aos animais e após cinco minutos, deu-se início ao monitoramento do comportamento ingestivo, continuando por 120 minutos, até o final das sessões experimentais. O monitoramento do comportamento ingestivo ocorreu nos tempos determinados no protocolo experimental: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Todos os experimentos foram realizados entre 7h e 11h e os animais não tiveram acesso a ração durante este período. Após a realização das sessões experimentais para o apetite por sódio, foram realizados testes para comprovar a especificidade dos resultados obtidos e a viabilidade da droga.

### 6.2 TESTE DO CAMPO ABERTO

Para observar se efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  na CeA ou MeA altera a atividade locomotora dos animais depletados de sódio, realizou-se o teste do campo aberto. Para realização deste protocolo, 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), caixa teste. Vinte e quatro horas após a depleção os animais receberam microinjeção de IL-1 $\beta$  na concentração de 1,6 ng/0,2  $\mu$ l ou solução fisiológica estéril. 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. O teste teve duração de 15 minutos, e foi registrado com câmera de vídeo digital (SAMSUNG) para posteriores análises.



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

### 6.3 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 e SCHWOB, 1975). Durante o período de habituação, os animais foram transferidos para uma caixa normal forrada com papel branco (caixa teste) cuja função era sinalizar oferta de um novo bebedouro. Esta habituação foi realizada por duas horas durante cinco dias, neste período, os animais recebiam dois bebedouros: o de água filtrada e o de solução sacarina 0,1%, a fim de habituá-los às condições experimentais. Ao final deste

período de treinamento, os animais foram transferidos para suas caixas originais, contendo apenas o bebedouro de água filtrada e ração. No quinto dia, os bebedouros de água filtrada foram removidos por 24 horas. Após o período de privação hídrica, os animais receberam microinjeção de IL-1 $\beta$ , na CeA ou MeA, na concentração de 1,6 ng/0,2  $\mu$ l. O grupo controle recebeu microinjeção de salina fisiológica estéril. Imediatamente após as microinjeções, os animais foram colocados nas caixas testes e após 15 minutos, receberam bebedouros graduados de água filtrada e de solução sacarina 0,1%. O registro dos volumes ingeridos foi iniciado cinco minutos após a oferta dos bebedouros e mantido, ao longo das sessões experimentais, por 120 minutos, nos tempos determinados no protocolo: 5,10,15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos.

#### 6.4 DEPLEÇÃO ORGÂNICA DE SÓDIO E DEPLEÇÃO ENCEFÁLICA DE SEROTONINA

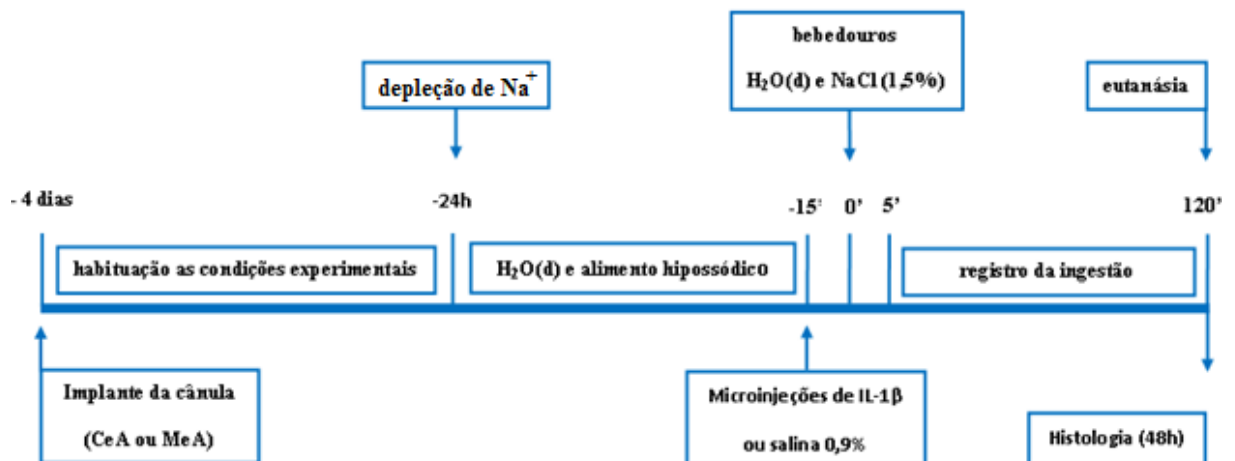
Para realização deste protocolo, os animais receberam implante de cânula guia no VL e CeA ou VL e MeA. Após dois dias de habituação as sessões experimentais, os animais receberam microinjeção de p-CPA na concentração de 200 ng/2  $\mu$ l no VL, para induzir a depleção encefálica de serotonina, e recolocados em suas caixas. Quarenta e oito horas depois da microinjeção de p-CPA, a ração e os bebedouros graduados de água destilada e os de solução salina hipertônica foram removidos para dar início a depleção de sódio, tal como o descrito no protocolo para depleção orgânica de sódio. 24 horas após a depleção de sódio, foram realizadas as sessões experimentais para o apetite por sódio. Para realização deste protocolo experimental, os grupos de animais que receberam implante bilateral de cânulas na CeA e VLE ou MeA e VLE foram divididos em quatro subgrupos distintos: p-CPA /IL-1 $\beta$ ; p-CPA /salina 0,9%; salina 0,9% /IL-1 $\beta$  e salina 0,9% /salina 0,9%. Os animais receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  na CeA ou MeA na concentração de de 1,6 ng/0,2  $\mu$ l ou salina 0,9% estéril, com mesmo volume, para os grupo controles depletado e não depletado de serotonina. Após 15 minutos da microinjeção, os bebedouros graduados de água destilada e os de solução salina hipertônica foram oferecidos aos animais, e cinco minutos depois, deu-se início ao monitoramento do comportamento, continuando em tempos determinados tal como estabelecido no protocolo, ao longo da sessão experimental, por 120 minutos. Todas as sessões experimentais foram realizadas entre 7h e 11h e os animais não tiveram acesso a ração durante este período.

## 6.5 REGISTRO DA TEMPERATURA CORPORAL

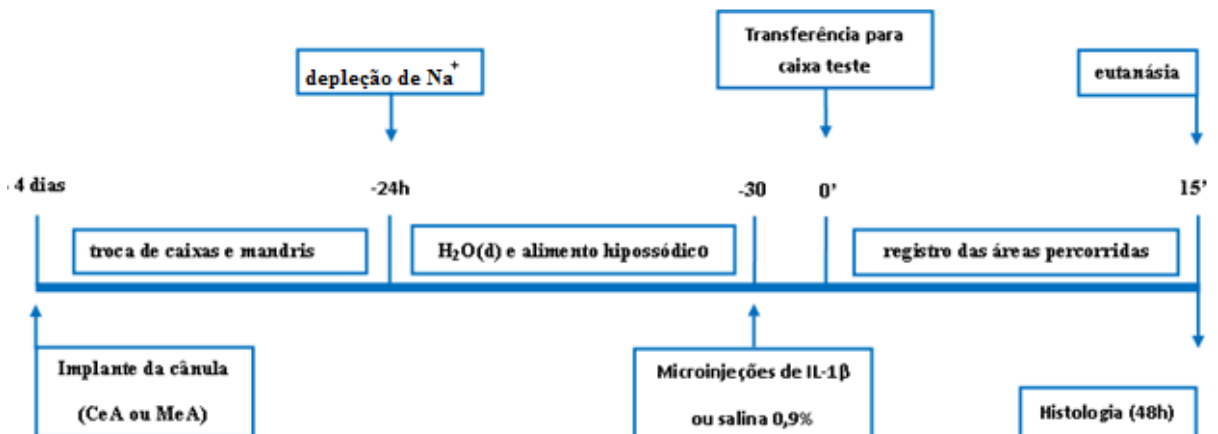
Para mensurar os efeitos da administração central da IL-1 $\beta$  na CeA ou MeA sobre a temperatura corporal de ratos depletados de sódio, os animais passaram por um período de habituação às condições experimentais que teve início no primeiro dia pós-operatório. O treinamento consistia em fixar as sondas com termômetros em suas caudas e transferi-los para uma caixa com 45cm x 60cm (caixa teste), onde permaneciam por 15 minutos. Esta habituação foi realizada por 4 dias e após o treinamento, os animais foram recolocados em suas caixas originais, forradas de maravalha, bebedouros de água destilada e de salina hipertônica e ração. No quarto dia, os animais foram depletados de sódio e 24 horas após a depleção deu-se início das sessões experimentais. No dia do experimento, a sonda com termômetro foi inserida 6-7cm, no cólon, e fixada na base da cauda do rato. Após introdução das sondas, os animais foram transferidos na caixa teste. O termômetro (Minipa Thermometer, Modelo: MT – 520) foi conectado a um dispositivo digital que registrava e exibia as temperaturas continuamente. O grupo experimental recebeu microinjeção de IL-1 $\beta$  na concentração de 1,6 ng/0,2  $\mu$ l, enquanto o grupo controle recebeu microinjeção de solução fisiológica estéril com mesmo volume. O registro da temperatura deu-se 15 minutos após as microinjeções e continuou, ao longo da sessão experimental, por 120 minutos, tal como estabelecido no protocolo.

## 7 DESENHOS EXPERIMENTAIS

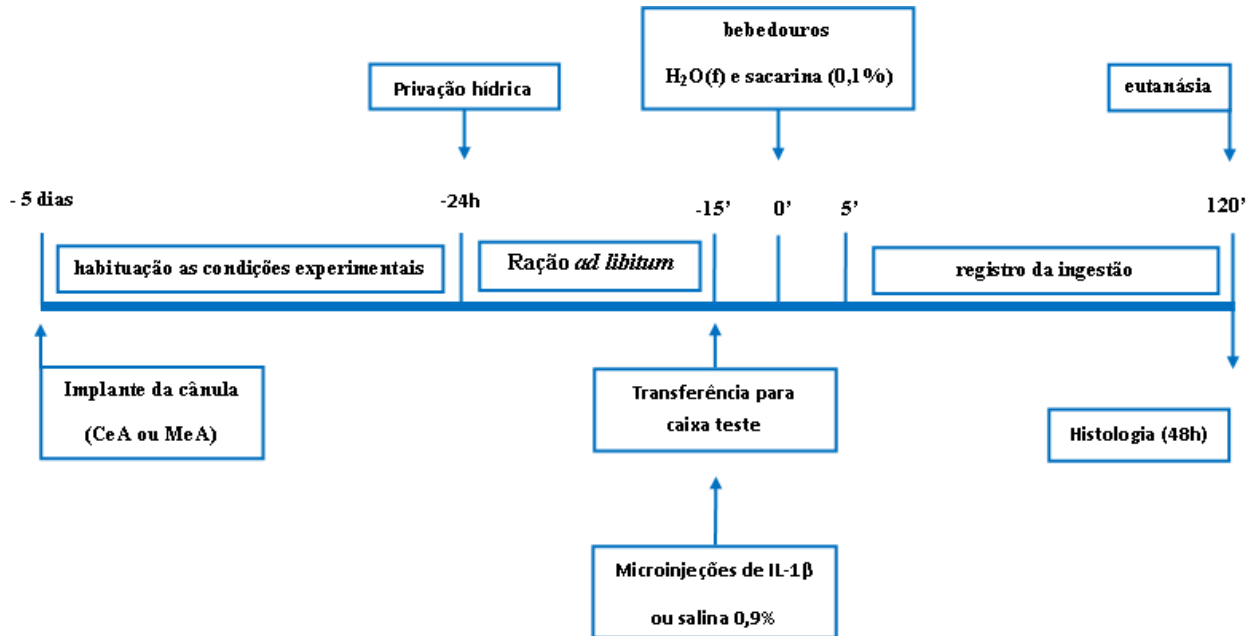
**Desenho Experimental 01** – Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  em diferentes concentrações (1,6, 0,8 e 0,4 e 0,1 ng/0,2  $\mu$ l) na CeA ou na MeA sobre a ingestão de solução salina hipertônica (1,5%) e de água destilada em ratos depletados de sódio.



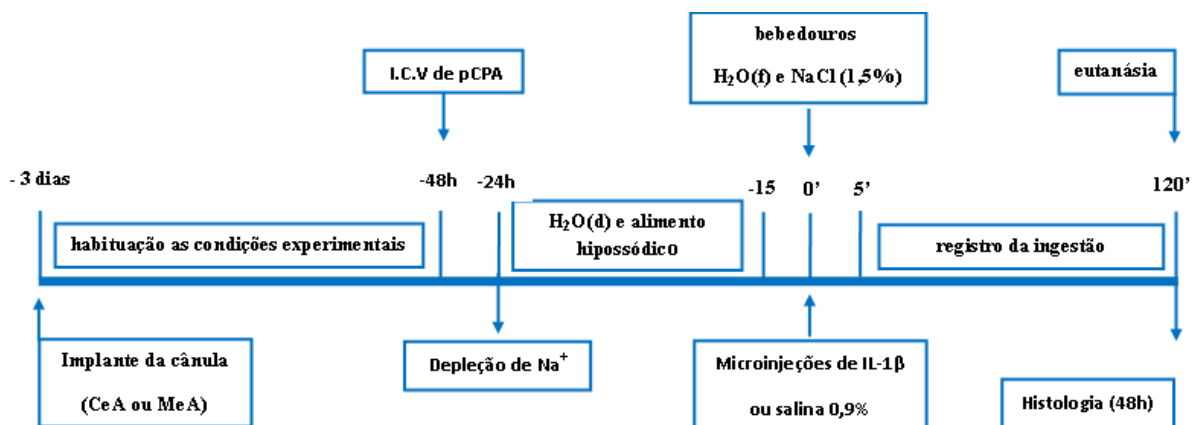
**Desenho Experimental 02** – teste do campo aberto: efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$  (1,6ng/0,2  $\mu$ l), na CeA ou MeA sobre a locomoção ratos depletados de sódio.



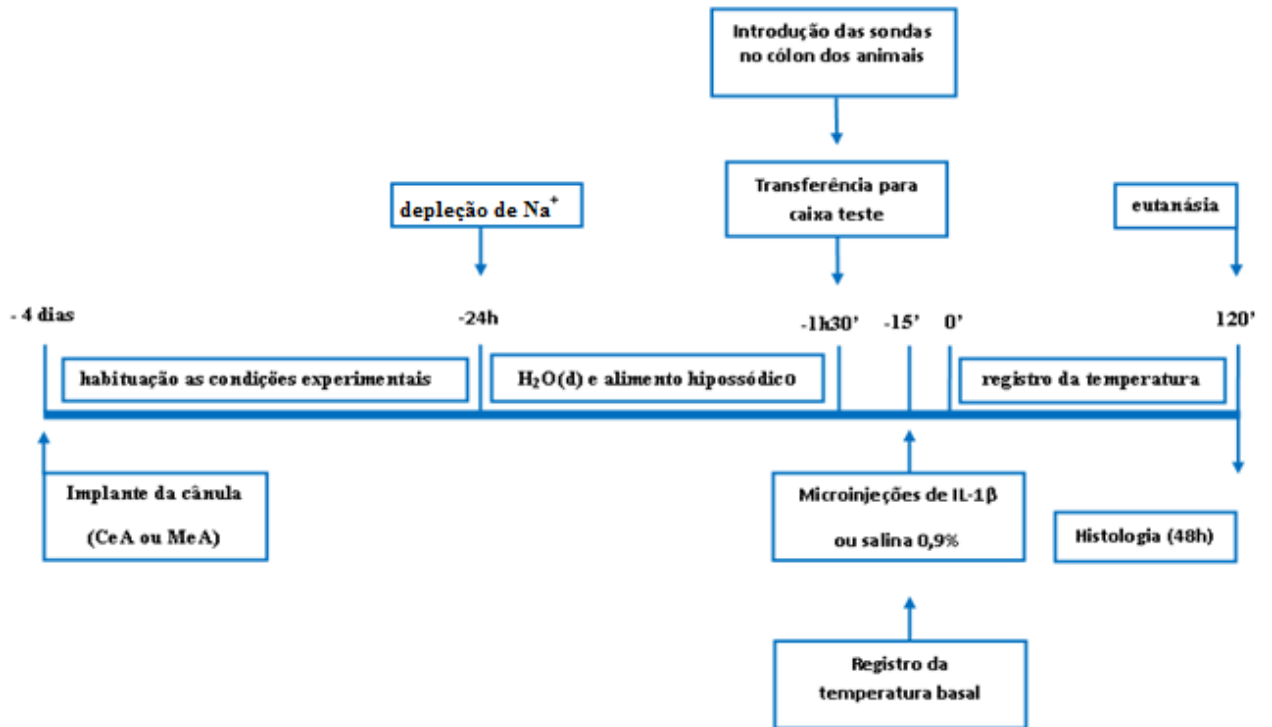
**Desenho Experimental 03** – teste de sobremesa: efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$  (1,6ng/0,2  $\mu$ l) na CeA ou MeA, sobre a ingestão de solução palatável de sacarina (0,1%) e água filtrada em ratos privados de água por 24 horas.



**Protocolo Experimental 04** – Depleção central de serotonina: efeito da depleção de 5-HT (p-CPA 200 nmol/ 2 $\mu$ l) sobre a ingestão de solução salina hipertônica (1,5%) e de água destilada em ratos depletados de sódio, tratados com microinjeções de IL-1 $\beta$  (1,6 ng/0,2 $\mu$ l) na CeA ou MeA.



**Desenho Experimental 05** – teste da temperatura corporal: efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$  (1,6ng/0,2  $\mu$ l) na CeA ou MeA sobre a temperatura de ratos depletados de sódio.



## 8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

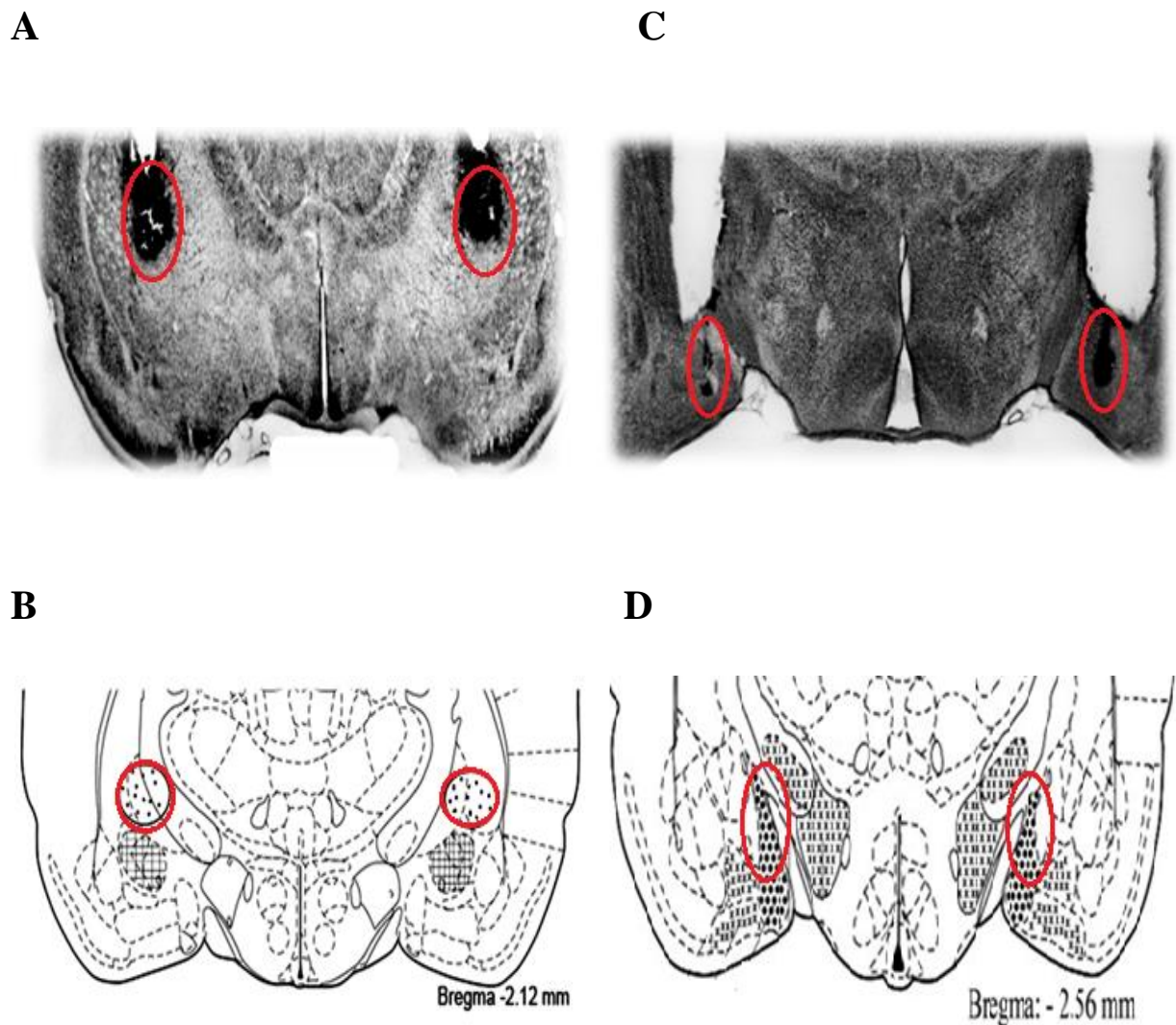
A análise de todos os dados obtidos foi realizada através do programa *GraphPad* versão 6.0. Para analisar os efeitos de microinjeções de IL-1 $\beta$  na CeA ou na MeA sobre o apetite por sódio de ratos depletados deste íon e comparar cada tratamento no tempo correspondente com o grupo controle, utilizou-se ANOVA modelo misto de duas vias (*two way mixed*), seguida do pós-teste de Tukey. Os grupos submetidos a depleção encefálica de serotonina por injeções de p-CPA no VL, também utilizou-se ANOVA modelo misto de duas vias (*two way mixed*), seguida do pós-teste de Tukey. 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 os efeitos da microinjeção de IL-1 $\beta$  na CeA ou MeA sobre a temperatura corporal em animais depletados de sódio, 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).



## 9 RESULTADOS

### Localização das microinjeções de IL-1 $\beta$ ou salina 0,9% na CeA e na MeA.

Fotomicrografias típicas de cortes de cérebro e diagramas situando as cânulas guia na CeA (A e B) e na MeA (C e D), respectivamente. Os dados dos animais cujo as cânulas ficaram fora das áreas de interesse não foram considerados na análise estatística.

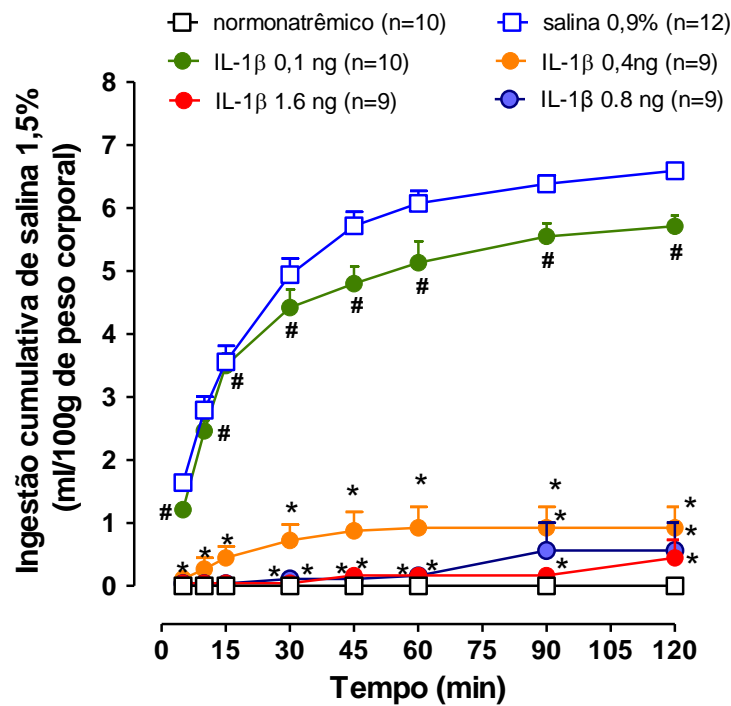


**Figura 2.** Fotomicrografias típicas (A e C) (autoral) e diagramas (B e D) (WATSON e PAXINOS, 2009) de corte de cérebro de rato mostrando local da microinjeção na CeA (A e B) e MeA (C e D) (círculo vermelho).

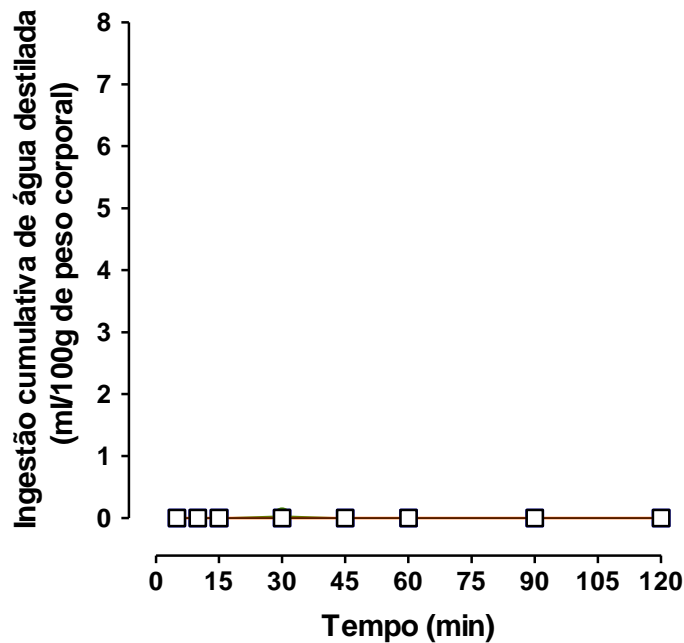
**Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  na CeA sobre a ingestão de solução salina hipertônica (1,5%) e água destilada em animais depletados de sódio.**

A administração de microinjeções de IL-1 $\beta$  na CeA nas concentrações de 1,6, 0,8 e 0,4ng/0,2 $\mu$ l inibem de forma semelhante a ingestão de salina hipertônica, exceto na concentração de 0,1ng/0,2 $\mu$ l cujo a ingestão foi semelhante a do grupo controle. Nota-se que efeito antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$  cinco minutos após o início da mensuração da ingestão de salina hipertônica, que se estende por todas as sessões experimentais. O teste ANOVA significativa interação entre tempo e tratamento [ $F(28,315) = 24,61; p < 0,0001$ ], sendo o valor da variável tempo [ $F(7,315) = 120,22; p < 0,0001$ ] e da variável tratamento [ $F(4,45) = 28,37; p < 0,0001$ ]. As concentrações de IL-1 $\beta$  inibiram com a mesma efetividade o comportamento de apetite por sódio. Existe diferença estatística significativa entre os grupos tratados com IL-1 $\beta$  na concentração 1,6 ng/0,2 $\mu$ l com os grupos IL-1 $\beta$  0,1ng/ 0,2 $\mu$ l: aos 5 minutos (1,6 ng:  $0,04 \pm 0,04$  mL; 0,1ng:  $1,2 \pm 0,13$  mL/100g de peso corporal), aos 30 minutos (1,6ng:  $0,04 \pm 0,04$  mL; 0,1ng:  $4,42 \pm 0,28$  mL/100g de peso corporal), aos 60 minutos (1,6ng:  $0,17 \pm 0,13$  mL; 0,1ng:  $5,13 \pm 0,34$  mL/100g de peso corporal) e aos 120 (1,6ng:  $0,44 \pm 0,28$  mL; 0,1ng:  $5,71 \pm 0,17$  mL/100g de peso corporal). Além disso, o grupo normonatremico, tratado com microinjeção salina 0,9 % na CeA não apresenta apetite por sódio, enquanto o grupo depletado de sódio e também tratados com salina 0,9% (controle) apresenta robusto apetite por sódio, com ingestão de  $6,59 \pm 0,09$  ml/100g de peso corporal aos 120 minutos (Figura 2A e tabela 1). Como esperado, os grupos depletados de sódio não apresentam ingestão de água significativa durante o curso das sessões experimentais (Figura 2B).

A



B



**Figura 3.** Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  na CeA sobre a ingestão de salina hipertônica (A) e água destilada (B) de ratos depletados de sódio. (\*) indica diferença em relação ao grupo controle e (#) indica diferença entre os grupos tratados com IL-1 $\beta$  e o grupo 0,1ng/rato. A IL-1 $\beta$  não promoveu efeito sobre a ingestão de água destilada. Os dados estão apresentados em média e erro padrão da média (média  $\pm$  EPM) e analisados com ANOVA modelo misto de duas vias seguida do pós-teste de Tukey;  $p < 0,05$ .

**Tabela 1.** Efeito de microinjeções de salina 0,9% na CeA sobre a ingestão de salina hipertônica (1,5%) em animais depletados de sódio (hiponatrêmico) e normonatrêmicos.

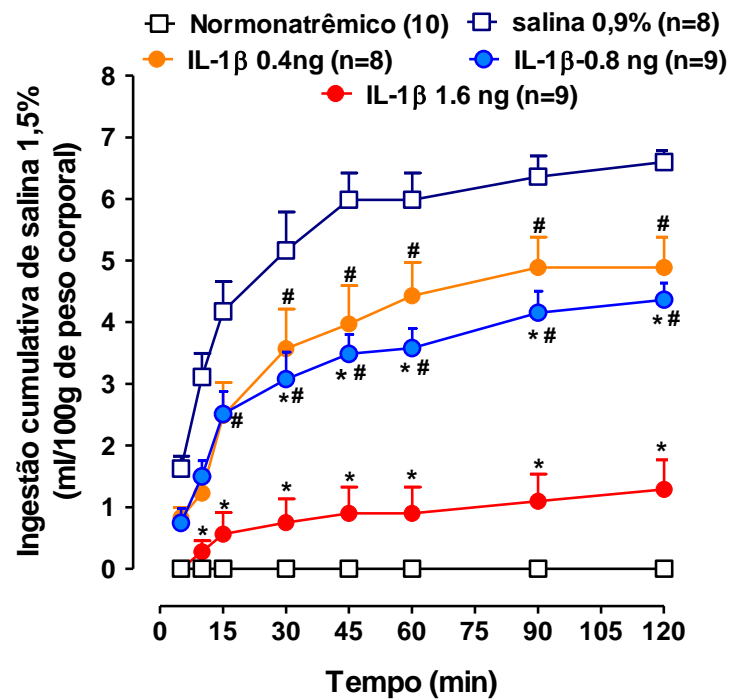
Natremia	Apetite por sódio			
	hiponatrêmico (12)		normonatrêmico (10)	
tempo	salina	água	salina	Água
5	1,64 ±0,12	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00
10	2,79 ± 0,21	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00
15	3,56 ±0,25	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00
30	4,94 ± 0,25	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00
45	5,71±0,22	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00
60	6,07 ± 0,19	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00
90	6,38± 0,13	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00
120	6,59 ± 0,09	0,00± 0,00	0,00± 0,00	0,00± 0,00

Nota: os números de animais utilizados nos experimentos estão indicados entre parênteses. Os dados foram analisados com ANOVA modelo misto de duas vias seguida do pós-teste Tukey ( $p < 0,05$ ) e estão representados como média e erro padrão da média (média ± EPM).

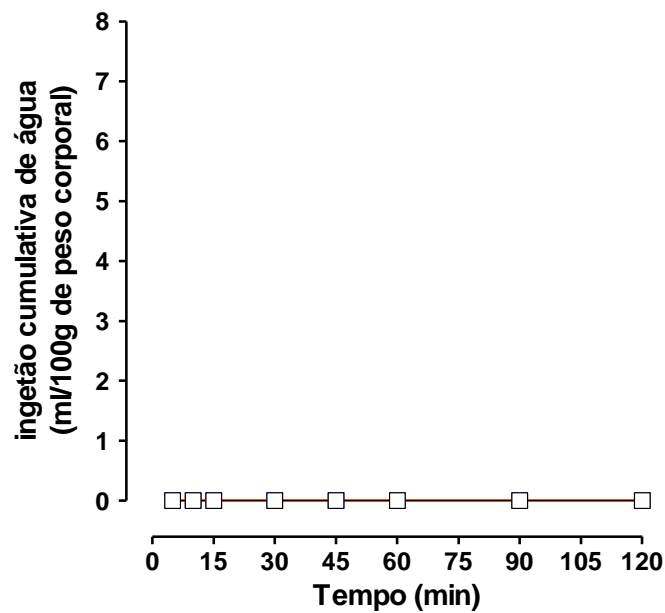
**Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  na MeA sobre a ingestão de solução salina hipertônica (1,5%) e água destilada em animais depletados de sódio.**

A administração de microinjeções de IL-1 $\beta$  na MeA nas concentrações de 1,6 ng e 0,8 ng/0,2 $\mu$ l induzem efeito antinatriorexigênico, embora a concentração de 1,6 ng foi mais eficiente na promoção deste efeito, de modo que se verifica a supressão deste comportamento durante toda a sessão experimental, enquanto a concentração de 0,8 ng inibe o apetite por sódio mas não suprime o comportamento e o período de latência para esta concentração foi de 15 minutos após o início da mensuração da ingestão de salina hipertônica. Além disso, verificamos que a concentração 0,4 ng/0,2 $\mu$ l não foi eficiente em inibir o apetite por sódio, de modo que a resposta apresentada é semelhante ao do grupo depletado de sódio tratado com salina 0,9% (controle) e por este motivo não foi necessário utilizar a concentração de 0,1 ng/0,2 $\mu$ l. O teste ANOVA mostra significativa interação entre tempo e tratamento [ $F_{(28, 259)}=13,31$ ;  $p<0,0001$ ], sendo o valor da variável tempo [ $F_{(7, 259)}=107,6$ ;  $p<0,0001$ ] e da variável tratamento [ $F_{(4, 37)}=56,30$ ;  $p<0,0001$ ]. O efeito antinatriorexigênico permaneceu ao longo dos 120 minutos das sessões experimentais, embora exista diferença estatística significativa entre as concentrações de 1,6ng/0,2 e as concentrações de 0,8 e 0,4ng/0,2: aos 15 minutos (1,6 ng:  $0,56 \pm 0,35$  mL; 0,8ng:  $2,5 \pm 0,37$  mL e 0,4ng:  $2,5 \pm 0,53$  mL/100g de peso corporal), aos 30 minutos (1,6 ng:  $0,75 \pm 0,38$  mL; 0,8 ng:  $3,08 \pm 0,44$  mL e 0,4ng:  $3,57 \pm 0,64$  mL/100g de peso corporal), aos 60 minutos (1,6 ng:  $0,90 \pm 0,45$  mL; 0,8 ng:  $3,58 \pm 0,32$  mL e 0,4 ng:  $4,43 \pm 0,55$  mL/100g de peso corporal) e aos 120 minutos (1,6 ng:  $1,29 \pm 0,48$  mL; 0,8 ng:  $4,36 \pm 0,27$  mL e 0,4 ng:  $4,89 \pm 0,49$  mL/100g de peso corporal). Além disso, o grupo normonatrêmico, tratado com microinjeção salina 0,9% na MeA não apresenta apetite por sódio, o grupo depletado de sódio e também tratados com salina 0,9% (controle) apresenta robusto apetite por sódio, com ingestão de  $6,60 \pm 0,52$  ml/100g de peso corporal aos 120 minutos (Figura 4A e tabela 2). Como esperado, os grupos depletados de sódio não apresentam ingestão de água significativa durante o curso das sessões experimentais (Figura 4B).

A



B



**Figura 4.** Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  na MeA sobre a ingestão de salina hipertônica (A) e água destilada (B) de ratos depletados de sódio. (\*) indica diferença em relação ao grupo controle e (#) indica diferença entre o grupo IL-1 $\beta$  1,6 ng/0,2 $\mu$ l. A IL-1 $\beta$  não promoveu efeito sobre a ingestão de água destilada. Os dados estão apresentados em média e erro padrão da média (média  $\pm$  EPM) e analisados com ANOVA modelo misto de duas vias seguida do pós-teste de Tukey;  $p < 0,05$ .

**Tabela 2.** Efeito de microinjeções de salina 0,9% na MeA sobre a ingestão de salina hipertônica (1,5%) em animais depletados de sódio (hiponatrêmico) e normonatrêmicos.

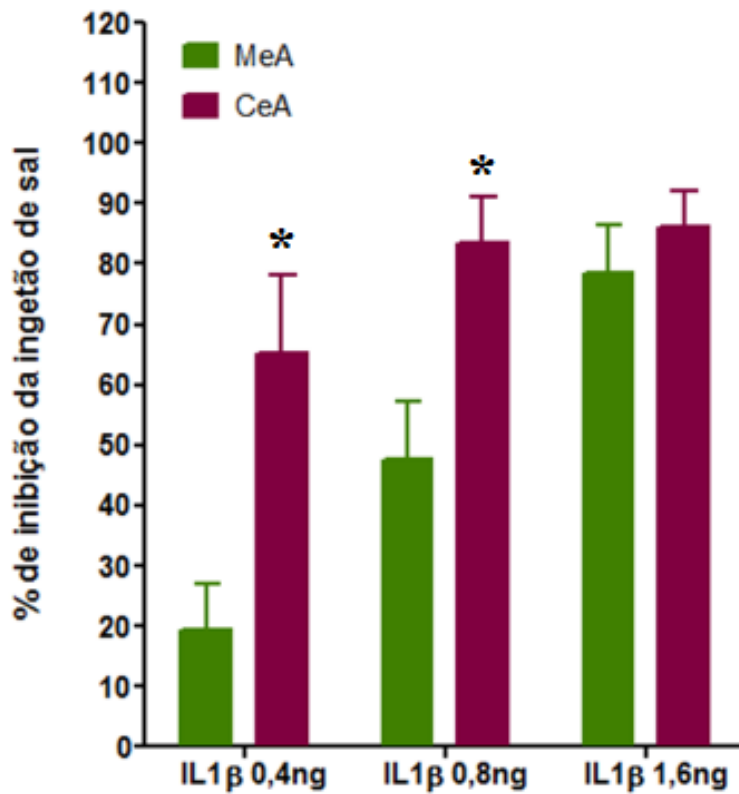
Natremia	Apetite por sódio			
	hiponatrêmico (8)		normonatrêmico (10)	
tempo	salina	água	Salina	água
<b>5</b>	1,63 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>10</b>	3,11 ± 1,09	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>15</b>	4,18 ± 1,38	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>30</b>	5,16 ± 1,78	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>45</b>	5,98 ± 1,22	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>60</b>	5,98 ± 1,22	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>90</b>	6,36 ± 0,94	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>120</b>	6,60 ± 0,52	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Nota: os números de animais utilizados nos experimentos estão indicados entre parênteses. Os dados foram analisados com ANOVA modelo misto de duas vias seguida do pós-teste Tukey ( $p < 0,05$ ) e estão representados como média e desvio-padrão (média ± SEM).

### **Comparação do percentual de inibição da IL-1 $\beta$ microinjetada na CeA e na MeA sobre a ingestão de salina hipertônica.**

O percentual de inibição da IL-1 $\beta$  sobre a ingestão de salina hipertônica dos grupos de animais que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  nas concentrações 0,4, 0,8 e 1,6 ng/0,2 $\mu$ l, ou de salina 0,9% na CeA foi comparado com o percentual de inibição da IL-1 $\beta$  sobre o comportamento ingestivo dos grupos que receberam os mesmos tratamentos na MeA. Transcorridos 120 minutos da oferta dos bebedouros de salina 1,5%, verificamos que não houve diferença na comparação do efeito inibitório da IL-1 $\beta$  na concentração de 1,6 ng/0,2 $\mu$ l entre a CeA e a MeA, de modo que nesta concentração a IL-1 $\beta$  inibe em aproximadamente 92,4% na CeA e 88,6% na MeA. Observa-se que na concentração de 0,8 ng/0,2 $\mu$ l, há diferença no efeito inibitório da IL-1 $\beta$  entre as áreas de estudo, de modo que na CeA a IL-1 $\beta$  mantém elevado percentual de inibição, 90,1%, enquanto na MeA o percentual de inibição da IL-1 $\beta$  foi discreto, 50,2%. Verificamos também que a IL-1 $\beta$  na concentração de 0,4 ng/0,2 $\mu$ l mantém o efeito antinatriorexigênico na CeA com 68,3% de inibição mas não tem efeito inibitório na MeA, onde o percentual foi de 19,8%. Ao compararmos o efeito antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$ , verificamos que a CeA é mais sensível à ação da IL-1 $\beta$  que a MeA para o apetite por sódio, de modo que o teste ANOVA de duas vias mostra significativa interação entre a área encefálica e a concentração da droga [ $F_{(2,55)} = 2,011$ ;  $p = 0.1436$ ], sendo o valor da variável área encefálica [ $F_{(2,55)} = 8,065$ ;  $p = 0.0008$ ], e o valor da variável concentração da droga [ $F_{(1,55)} = 14,41$ ;  $p = 0.0004$ ], sendo o volume total de salina hipertônica ingerido na concentração 1,6 ng/0,2 $\mu$ l na CeA de  $0,44 \pm 0,28$  mL/100g de peso corporal e na MeA de  $1,2 \pm 0,48$  mL/100g de peso corporal, na concentração de 0,8 ng/0,2 $\mu$ l na CeA de  $0,56 \pm 0,44$  mL/100g de peso corporal e na MeA de  $4,37 \pm 0,23$  mL/100g de peso corporal e na concentração de 0,4 ng/0,2 $\mu$ l na CeA de  $0,92 \pm 0,33$  mL/100g de peso corporal e MeA:  $4,88 \pm 0,49$  mL/100g de peso corporal.

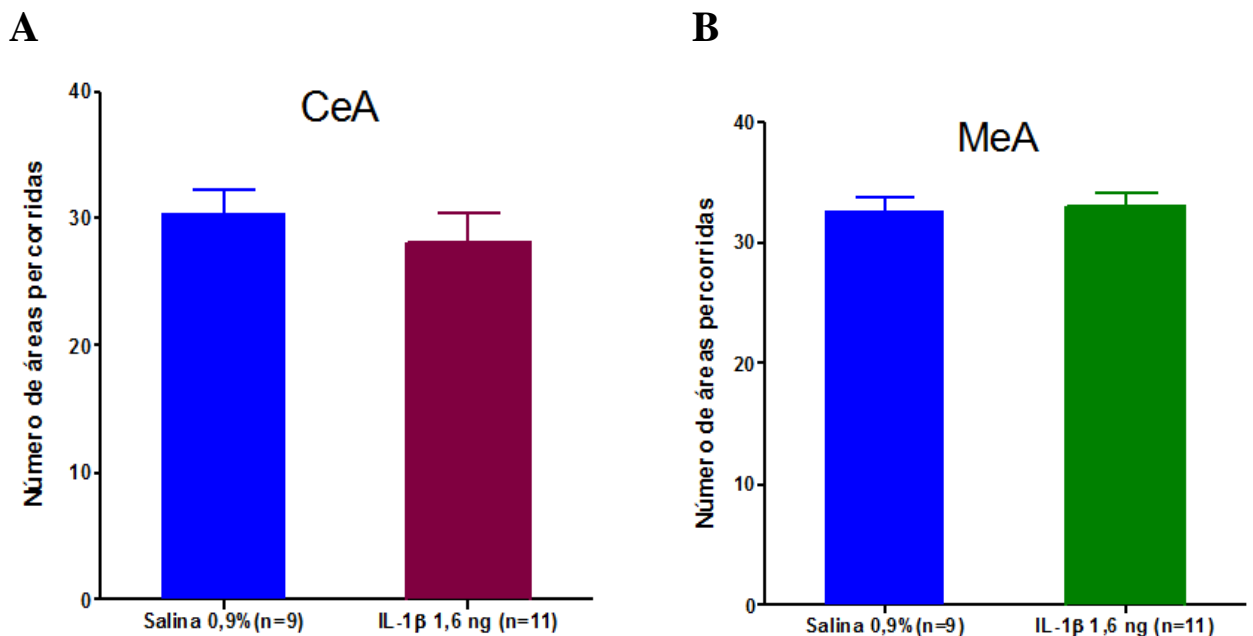




**Figura 5.** Comparação do percentual de inibição da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA sobre ingestão cumulativa de salina hipertônica (120 minutos) de ratos depletados de sódio em relação ao grupo controle, considerando a média de todos os animais com 100%. (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre as áreas CeA e MeA tratadas com IL-1 $\beta$  nas concentrações de 0,4, 0,8 e 1,6 ng/rato. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (média  $\pm$  EPM) e foram analisados com ANOVA modelo de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

**Teste do campo aberto: efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$  na concentração 1,6 ng/0,2 $\mu$ l, ou salina 0,9%, na CeA ou na MeA sobre a atividade locomotora de ratos depletados de sódio.**

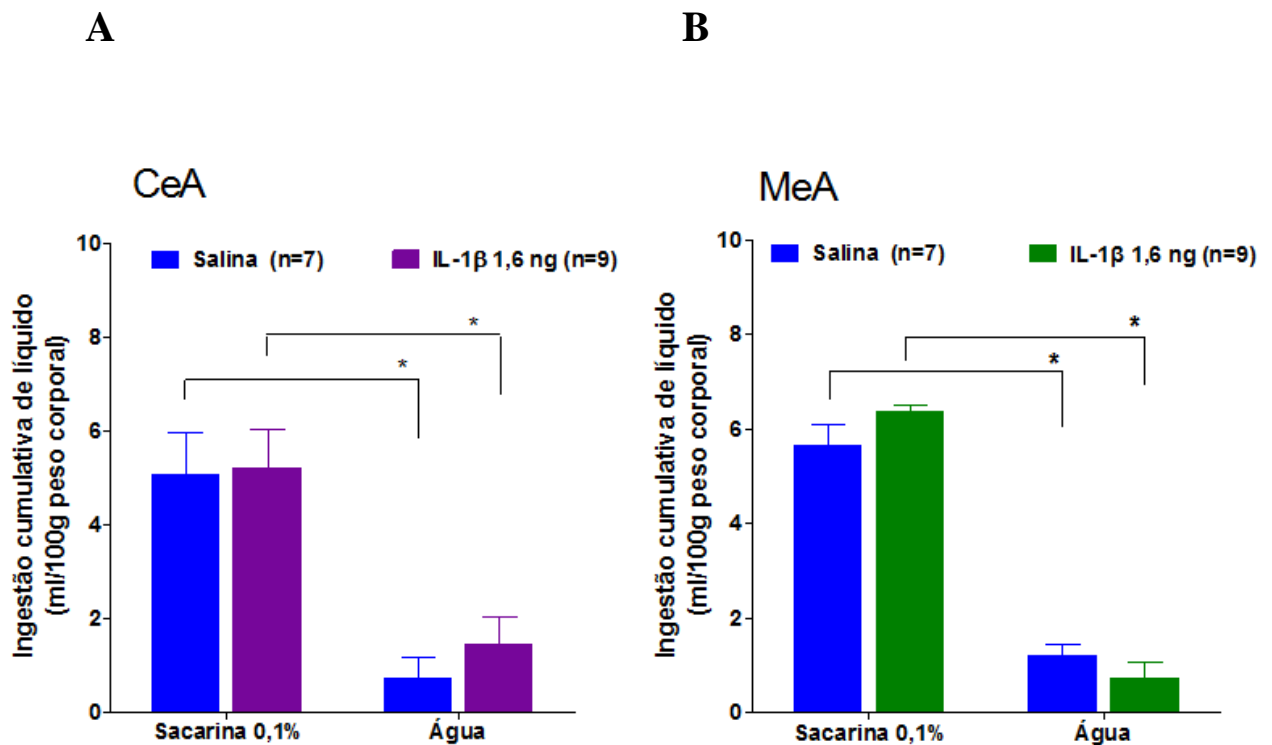
O teste de campo aberto não revela alterações significativas na atividade locomotora dos grupos de animais tratados com IL-1 $\beta$  ou salina 0,9%. Na CeA, o número de áreas cruzadas foi  $36,8 \pm 2,83$  e  $34,1 \pm 2,98$ , respectivamente [ $t = 0,808$ ;  $gL=16$ ;  $p = 0,431$ ]. Na MeA, o número de áreas cruzadas foi  $32,7 \pm 1,13$  e  $33,0 \pm 1,06$ , respectivamente [ $t = 0,214$ ;  $gL= 18$ ].



**Figura 6.** Número de áreas percorridas pelos ratos no teste do campo aberto após microinjeções de IL-1 $\beta$  na CeA (A) e na MeA (B) 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 Hedônico: efeito da microinjeção de IL-1 $\beta$  na dose 1,6ng/rato ou salina 0,9% na CeA e na MeA sobre a ingestão de sacarina 0,1% de ratos privados de água por 24 horas**

A ingestão preferencial de uma solução aprazível caracteriza o comportamento hedônico proposto pelo teste de sobremesa. Este comportamento não é alterado no grupo tratado com IL-1 $\beta$  ou salina 0,9% na CeA ( $5,042 \pm 0,92$  e  $5,21 \pm 0,807$  ml/100g de peso corporal, respectivamente) e na MeA ( $6,34 \pm 0,132$  e  $5,64 \pm 0,467$  ml/100g de peso corporal, respectivamente) [ $t= 0,571$ ;  $gL=12$ ,  $p =0,573$ ]. Não há diferença na ingestão de água filtrada no grupo tratado com IL-1 $\beta$  ou salina 0,9% na CeA ( $0,714 \pm 0,463$  e  $0,714 \pm 0,463$  ml/100g de peso corporal, respectivamente) tampouco na MeA ( $0,734 \pm 0,348$  e  $1,20 \pm 0,257$ ml/100g de peso corporal, respectivamente) [ $t=0,3788$   $gL=12$ ,  $p =0,711$ ].

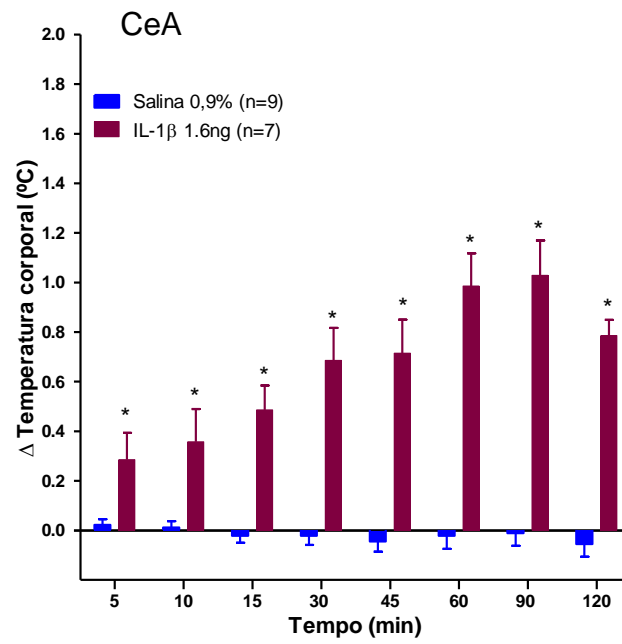


**Figura 7.** Ingestão cumulativa de sacarina 0,1% e água filtrada após microinjeções de IL-1 $\beta$  ou salina 0,9%, na CeA (A) ou na MeA (B). A ingestão de animais tratados com IL-1 $\beta$  foi comparada a ingestão do grupo controle. (\*) significa diferença estatisticamente entre a ingestão cumulativa de sacarina e água filtrada dentro do mesmo grupo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O tratamento estatístico utilizado foi o teste t de *Student* não pareado ( $t < 0,05$ ).

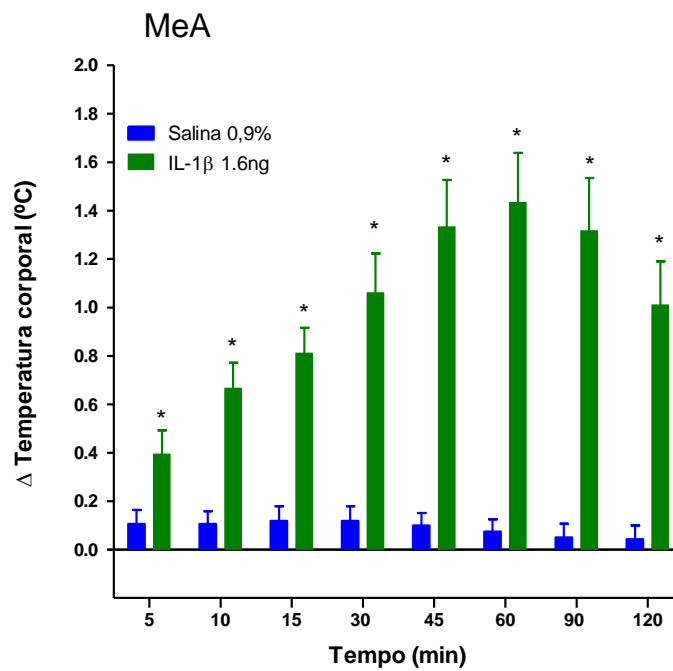
**Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  na concentração de 1,6ng/ 0,2 $\mu$ l ou salina 0,9% na CeA ou na MeA sobre a temperatura corporal de ratos depletados de sódio.**

Os grupos de animais tratados com IL-1 $\beta$ , na CeA ou MeA, após 5 minutos da administração da droga, apresentaram significativo aumento da temperatura corporal quando comparados aos respectivos grupos controles. A hipertermia perdura até o final das sessões experimentais, enquanto que nos animais controle a temperatura corporal não apresentou variações significativas. Na CeA tem-se: aos 5 minutos ( $0,29 \pm 0,71$  e controle,  $0,22 \pm 0,222$ ), aos 30 minutos ( $0,67 \pm 0,13$  e controle,  $-0,22 \pm 0,04$ ) aos 60 minutos ( $0,98 \pm 0,13$  e controle,  $0,022 \pm 0,052$ ) e aos 120 minutos ( $0,79 \pm 0,063$  e controle,  $-0,06 \pm 0,05$ ), com significativa interação tempo e tratamento [ $F(7,72) = 2,89$ ,  $p < 0,0102$ ], sendo a variável tempo [ $F(1,72) = 137,51$   $p < 0,0001$ ] e a variável tratamento [ $F(7,72) = 2,83$ ,  $p < 0,0115$ ]. Na MeA tem-se: aos 5 minutos ( $0,39 \pm 0,098$  e controle,  $0,11 \pm 0,98$ ), aos 30 minutos ( $1,06 \pm 0,16$  e controle,  $0,13 \pm 0,061$ ), aos 60 minutos ( $1,43 \pm 0,21$  e controle,  $0,08 \pm 0,05$ ) e aos 120 minutos ( $1,01 \pm 0,18$  e controle,  $0,04 \pm 0,05$ ), com significativa interação tempo e tratamento [ $F(7,224) = 4,09$ ,  $p < 0,0003$ ], sendo a variável tempo [ $F(1,224) = 184,39$ ,  $p < 0,0001$ ] e a variável tratamento [ $F(7,224) = 3,09$ ,  $p < 0,0040$ ] (Figura 9). O teste ANOVA para comparação do percentual do efeito hipertérmico após microinjeção de IL-1 $\beta$ , na concentração de 1,6ng/0,2 $\mu$ l, nas áreas de estudo mostra que a MeA ser mais sensível à hipertermia (Figura 7).

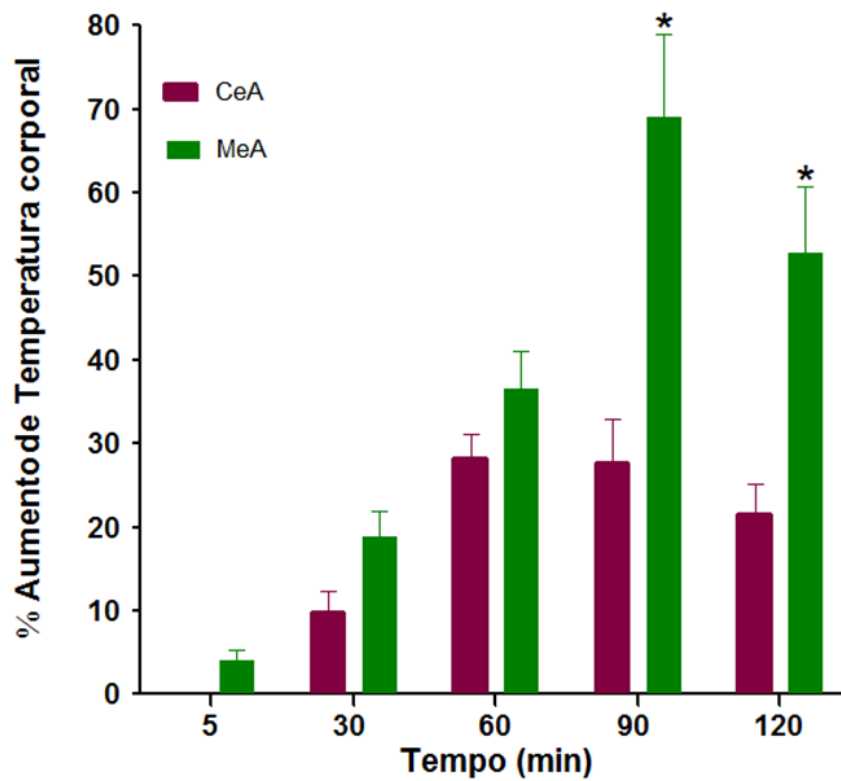
A



B



**Figura 8.** Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  na CeA (A) e na MeA (B) sobre a temperatura corporal de de ratos depletados de sódio. (\*) indica diferença entre os grupos que receberam microinjeções de IL1 $\beta$  na dose 1,6 ng/rato e o grupo controle. Os dados foram tratados com ANOVA mista de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .

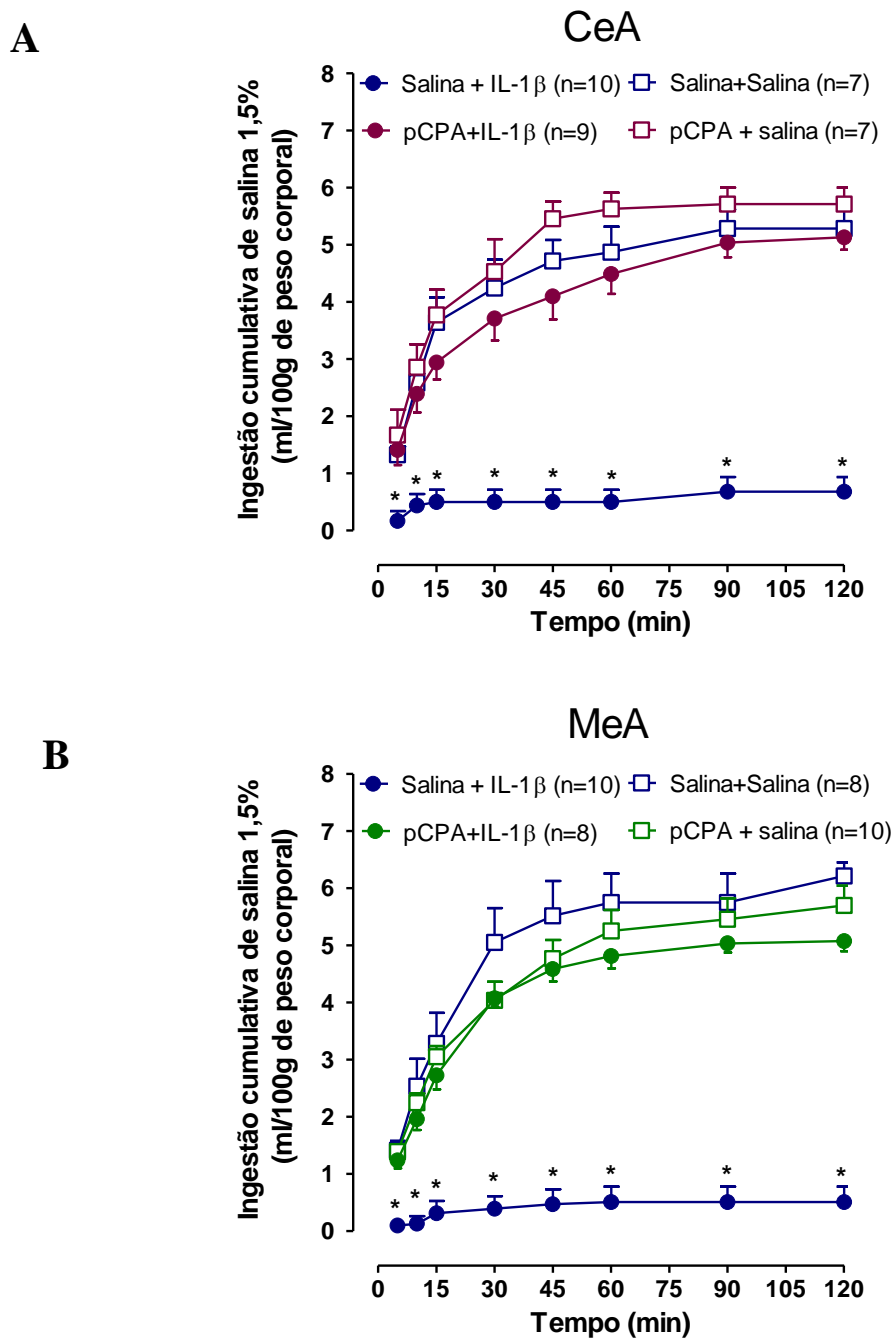
**Comparação do percentual do efeito hipertérmico da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA.**

**Figura 9:** Comparação do percentual do efeito hipertérmico induzido pela microinjeção de IL-1 $\beta$ , na concentração de 1,6ng/0,2 $\mu$ l, na CeA e na MeA em relação aos grupos controle, considerando a média de todos os animais como 100% (120 minutos). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O (\*) indica diferença estatisticamente significante entre as áreas. Os dados foram tratados com ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .

**Efeito da depleção encefálica de serotonina induzida por microinjeções de p-CPA na concentração 100 µg/2µl no ventrículo lateral, sobre o efeito antinatriorexigênico de IL-1β na concentração de 1,6 ng/0,2 µl, na CeA ou na MeA de ratos com depleção orgânica de sódio.**

Quarenta e oito horas após administração de p-CPA no VL os animais foram depletados de sódio e receberam microinjeção de IL-1β na concentração de 1,6 ng/0,2 µl, CeA ou na MeA. Os animais depletados de serotonina e tratados com IL-1β apresentam ingestão de salina hipertônica similar ao grupo controle não depletado de serotonina e tratado com salina 0,9% na CeA ( $5,286 \pm 0,756$  e  $5,714 \pm 0,756$ , respectivamente) e na MeA ( $6,217 \pm 0,585$  e  $5,075 \pm 0,498$ , respectivamente) aos 120 minutos. Tanto na CeA quanto na MeA o teste ANOVA mostra que há interação entre tempo e tratamento, sendo na CeA [ $F(21,210) = 11,93$ ;  $p < 0,0001$ ], sendo a variável tempo [ $F(3,210) = 53,16$ ;  $p < 0,0001$ ] e a variável tratamento [ $F(7,210) = 119,31$ ;  $p < 0,0001$ ] e na MeA [ $F(21,210) = 18,61$ ;  $p < 0,0001$ ] sendo a variável tempo [ $F(3,210) = 68,31$ ;  $p < 0,0001$ ] e a variável tratamento [ $F(21,210) = 189,20$ ;  $p < 0,0001$ ] (Figura 10. Tabela 3).

A administração de p-CPA no VL e o posterior tratamento com salina 0,9% na CeA ou na MeA não altera o apetite por sódio quando comparado ao grupo que recebeu salina 0,9% no VL (não depletado de serotonina) tratado com salina 0,9% na CeA ou na MeA. Por outro lado, os animais não depletados de serotonina que receberam IL-1β na concentração de 1,6ng/0,2µl na CeA ou na MeA apresentaram inibição da ingestão de salina hipertônica 1,5%.



**Figura 10.** Efeito de microinjeções de IL-1 $\beta$  na CeA (A) e na MeA (B) sobre a ingestão de salina hipertônica e de ratos depletados de sódio. (\*) indica diferença entre os grupos depletado e o não depletado de serotonina, na CeA ou na MeA, que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  na dose 1,6 ng/rato. Os dados foram tratados com ANOVA modelo misto de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ .



**Tabela 3.** Efeito da depleção encefálica de serotonina sobre a ingestão de água (mL) de ratos depletados de sódio que receberam microinjeções de IL-1 $\beta$  na concentração de 1,6ng/0,2 $\mu$ l ou salina 0,9% na CeA ou na MeA.

tempo	Ingestão de água			
	CeA		MeA	
	p-CPA + IL-1 $\beta$ (9)	p-CPA + salina 0,9% (7)	p-CPA + IL-1 $\beta$ (8)	p-CPA + salina0,9% (10)
5	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
10	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
15	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
30	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
45	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
60	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
90	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
120	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

Nota: os números de animais utilizados nos experimentos estão indicados entre parênteses. Os dados foram analisados com ANOVA modelo misto de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) e estão representados como média e desvio-padrão (média  $\pm$  SEM).

## 10 DISCUSSÃO

### 10.1 Efeito antinatriorexigênico de IL-1 $\beta$ na CeA ou na MeA sobre o apetite por sódio em ratos depletados deste íon.

Microinjeções de IL-1 $\beta$  em diferentes concentrações na CeA ou na MeA inibem o apetite por sódio em ratos depletados deste íon, evidenciando a ação modulatória desta citocina em áreas do parênquima encefálico. Observamos também que não há ingestão de água destilada nos grupos normonatremicos, visto que os animais se encontram em condições normais de volemia, bem como não há ingestão de água destilada nos grupos depletados de sódio, uma vez que após quatro horas do tratamento com furosemida, os bebedouros de água destilada são disponibilizados aos animais, a fim de restabelecer parte do volume perdido na natriurese, acentuar a hiponatremia e ativar os mecanismos de conservação do sódio, essenciais para desencadear o comportamento de busca e aquisição deste íon.

A IL-1 $\beta$  é uma das citocinas que medeia a relação entre os sistemas nervoso central, endócrino e imune. Ao acessar o SNC, por rotas que não são mutuamente excludentes, acessam o encéfalo podendo modular funções que são de controle central, como a homeostasia hidrossalina (STEINMAN et al., 2004; PA LUZ, 2009). A IL-1 $\beta$  tem alta afinidade ao receptor IL-1R1, de modo que ao se ligar ao sítio deste receptor, promove o recrutamento da proteína acessória, viabilizando as suas ações, como a inibição do apetite por sódio (ALLAN et al., 2005; SCHETT et al., 2016.; CERQUEIRA et al., 2016). Estudos têm demonstrado que o receptor IL-1R1 apresenta larga distribuição no encéfalo, com elevada expressão em áreas hipotalâmicas envolvidas com a regulação do comportamento ingestivo e o comportamento hedônico (FARRAR et al., 1987; PARNET et al., 2002), bem como na CeA e na MeA.

Uma das vias de acesso rápido e livre da IL-1 $\beta$  ao SNC são os CVOs (QUAN et al., 1993; SCULZ e ENGELHARDT, 2005). Alterações na natremia e no volume dos líquidos corporais são primeiramente percebidos pelos neurônios do SFO, do OVLT e da AP, bem como o NTS, que também são áreas sensíveis a ANGII e ALDO, além dos neurotransmissores como GABA, glutamato, histamina, opióides e serotonina (JOHNSON e GROSS, 1993., FITZSIMONS, 1998; GEELING e LOWEY, 2008; TANAKA et al., 2016). Os CVOs apresentam conexões recíprocas e com áreas integradoras das informações periféricas, como o MnPO, o SON, o PVN e o LPBN, bem como áreas envolvidas com a

resposta hedônica, como o Nacb, a habênula, a MeA e a CeA (NA et al., 2007; BOURQUE, 2008., GEERLING e LOEWY., 2008; MENANI, 2014; HURLEY e JOHNSON, 2015). Estas áreas compõem uma imbricada rede de controle central da homeostasia hidroeletrolítica que diante de perturbações nos compartimentos líquidos corporais, desencadeia respostas efetoras autonômicas, endócrinas e comportamentais.

Diversos estudos têm demonstrado que após tratamento com injeções periféricas de LPS ou IL-1 $\beta$  neurônios das áreas que integram a *lamina terminalis* e a AP apresentam elevada imunoreatividade a FOS (WATKINS et al., 1995; ELMQUIST et al., 1996). Estudos do laboratório de Neurociências (ICS-UFBA) evidenciaram o efeito antidipsogênico da IL-1 $\beta$  no SNC. Verifica-se que ratos com desidratação extracelular ou desidratação intracelular ou hipovolêmicos, que recebem microinjeção i.c.v de IL-1 $\beta$  apresentam inibição da ingestão de água. Tal efeito parece depender de um componente opioide endógeno, visto que quando os ratos recém pré-tratamento com microinjeções i.c.v do naloxona, antagonista opioide inespecífico, ou do nor-Binaltorfimina (nor-BNI), antagonista dos receptores kapa opioides, impossibilita o efeito antidipsogênico desta citocina (DE CASTRO E SILVA et al., 2006; PALUZ, et al., 2006; 2009). Verificou-se também que o efeito antinatriorexigênico promovido por microinjeções i.c.v de IL-1 $\beta$ , em ratos depletados de sódio, é suprimido quando há o pré-tratamento com nor-BNI (PALUZ et al., 2009). Corroborando estes dados, estudos *in vitro* e *in vivo* mostram interação entre a IL-1 $\beta$  e os opioides. Verifica-se que culturas de astrócitos hipotalâmicos, após tratamento com IL-1 $\beta$ , aumentam a expressão de receptores opioides do tipo mu (RO- $\mu$ ), Kapa (RO- $\kappa$ ) e delta (RO- $\delta$ ) (RUZICKA e AKIL, 1997). Recentemente mostramos que a IL-1 $\beta$  atua em áreas periventriculares, como o SFO e o MnPO, e que em ratos depletados de sódio, tem ação antinatriorexigênica, bem como há indícios de ação antidipsogênica, visto que os ratos submetidos ao teste hedônico da sobremesa quando privados de água por 24 horas, não apresentam ingestão hídrica (CERQUEIRA et al., 2016). Corroborando este dado, estudos *in vitro* mostram que a IL-1 $\beta$  altera a excitabilidade dos neurônios MnPO e SFO (OTA et al., 1997; DENSSON et al., 2003).

No presente estudos verificamos que a administração da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA inibem o apetite por sódio em ratos depletados deste íon. Os núcleos do complexo amigdalóide participam dos aspectos hedônicos relacionados a vários comportamentos de controle central, dentre eles a de sede e apetite por sódio (SAH et al., 2003; NEUGEBAUER et al., 2004), bem recebem projeções de diversas áreas do SNC envolvidas na regulação do

apetite por sódio e controle da pressão arterial, onde se destacam projeções angiotensinérgicas do SFO e da AV3V, além das conexões recíprocas com o NTS, a AP, a área septal medial (ASM) e LPBN (JOHNSON e THUNHORST, 1997; JOHNSON et al., 1999.; GEERLING et al., 2007). Os núcleos do complexo amigdalóide também apresentam conexões recíprocas com as áreas hipotalâmicas lateral e ventromedial, que estão envolvidas no controle do comportamento ingestivo (COWAN et al., 1965; SAH et al., 2003; MIROLI et al., 2010).

O complexo amigdalóide compreende três distintos grupos, subdivididos em treze subgrupos, localizados no lobo médio-temporal. São grupos da amígdala: o grupo basolateral (BLA), o grupo cortical e o grupo centromedial, formado pela CeA e MeA, e uma porção do BNST, que são distintos tanto em bases citoarquitectônicas e neuroquímicas, quanto as conexões de seus neurônios (SAH et al., 2003; OLMOS et al., 2004; BELTRAMINO, 2004). A CeA e a MeA estão localizadas na porção dorsomedial do complexo amigdalóide (SAH et al., 2003). A CeA se limita lateralmente ao complexo basolateral, dorsalmente ao globo pálido e medialmente à estria terminal e apresenta quatro subdivisões: a subdivisão capsular (CeC), a subdivisão lateral (CeL), a subdivisão intermediária (CeI) e a subdivisão mediana (CeM) (JOLKKONEN e PITKÄNEN, 1998; SAH et al., 2003). A MeA tem início ao núcleo do trato olfatório lateral, se limita medialmente ao trato óptico e se estende caudalmente, limitando-se medialmente pelo trato óptico (SAH et al., 2003). O grupo centromedial da amígdala e as extensões às partes laterais e medianas do BNST são coletivamente chamadas de amígdala estendida, devido a origem ontogenética comum (JOHNSON et al., 1999; OLMOS et al., 2004).

Diversos estudos utilizaram a lesão eletrolítica para tentar evidenciar a participação do grupo centromedial da amígdala no controle do apetite por sódio. Observa-se que ratos depletados de sódio ou tratados com intraperitoneal de ioimbina, apresentam o apetite por sódio, mas após lesão eletrolítica da CeA ou do BNST, tem-se uma diminuição da ingestão de salina hipertônica e quando a CeA e o BNST foram simultaneamente lesados, há inibição do comportamento (ZARDETTO-SMITH et al., 1994). Observa-se também que ratos com lesão na CeA não apresentam apetite por sódio quando o comportamento é induzido por tratamento com furosemida e há diminuição da ingestão de salina hipertônica quando o comportamento é induzido pelo tratamento com DOCA ou ANGII. Contudo verifica-se que a lesão na CeA não modifica a ingestão de água, de sacarose e de alimentos, sugerindo que a CeA é uma estrutura essencial ao apetite por sódio (GALAVARNA et al., 1992). Lesão de

CeA promove diminuição da ingestão de sódio diária não regulatória em ratos normonatrêmicos, suprime o comportamento em ratos depletados de sódio, mas não se verifica alterações às reações gustatórias ao sabor (GALAVERNA et al., 1993). Observa-se que ratos com lesão eletrolítica na MeA apresentam supressão da ingestão de salina hipertônica quando o comportamento é induzido por tratamento com ALDO, mas não há alterações na appetite por sódio quando os ratos foram depletados de sódio ou adrenalectomizados, sugerindo a possibilidade da existência de sistemas distintos sensíveis a aldosterona e a angiotensina no SNC (SCHULKIN et al., 1989). Além disso, projeções opioidérgicas, GABAérgicas e glutamatérgicas emergem do Nacb, e do PFC para a amígdala estendida, compondo assim o circuito da motivação e recompensa, que é importante para desencadear e manter o apetite por sódio (BAXTER e MURRAY, 2002; BERRIGDE, 2009). Neurônios HSD2, sensíveis à aldosterona, se projetam da AP à CeA (GEERLING et al., 2006).

A amígdala integra as áreas encefálicas que compõem o sistema límbico, envolvido com os comportamentos emocionais e sexuais e funções cognitivas como a memória, a aprendizagem e a motivação e os transtornos psiquiátricos (ROBERTS et al., 1982; SACHDEV et al., 2007). Verifica-se em estudo com pacientes que sofreram acidente vascular cerebral (AVC) menor volume na amígdala e comprometimento cognitivo, além disso, estes pacientes foram mais vulneráveis ao surgimento da depressão, doze meses depois do AVC (SACHDEV et al., 2007). A anedonia é uma das manifestações comportamentais clássicas de indivíduos acometidos por doenças, incluindo a depressão, e está diretamente relacionada à ação da IL-1 $\beta$  em áreas encefálicas que coordenam o controle de diversos comportamentos (DUNN et al., 2009). Outros estudos mostram o envolvimento desta citocina nas funções cognitivas como aprendizado e memória, além dos transtornos emocionais (PUGH et al., 2001; BANKS et al., 2002; GOSHEN et al., 2008). Diversos estudos têm demonstrado a expressão dos receptores IL-1R nos núcleos da amígdala tanto em ratos saudáveis quanto em ratos com isquemia (YABUUCHI et al., 1994a; 1994b; PATEL, 2007).

Diante do envolvimento da amígdala e a ação da IL-1 $\beta$  em funções homeostáticas e nas funções supracitadas, nos propusemos a investigar a ação da IL-1 $\beta$  na CeA e MeA sobre o apetite por sódio. Ao compararmos o efeito antinatriorexigênico entre as áreas de estudo, sugerimos que a CeA parece ser mais sensível a ação da IL-1 $\beta$  que a MeA, dado que as concentrações que aboliram o comportamento na CeA tem efeito similar, porém não se

verifica a mesma eficiência na MeA, assim sendo, sugerimos que a elevada sensibilidade da CeA seja devido envolvimento desta área nos mecanismos motivacionais e hedônicos envolvidos no apetite, bem como as aferências relacionadas ao sabor salgado que chegam nesta área (BERRIGDE, 1996; CARDINAL et al., 2002; KRAUSE e SAKAI, 2007; GEERLING e LOEWY, 2008; MORRIS et al., 2008). Corroborando tal suposição, Na e colaboradores (2007) mostram aumento na expressão de c-Fos nas áreas que integram o circuito límbico, como o BNST, Nacb e os núcleos da amígdala. Observa-se que ratos normonatrêmicos em contato com a salina hipertônica apresentam comportamento aversivo e que após o condicionamento e a depleção de sódio, os ratos apresentam comportamento hedônico e aumento da atividade neuronal no Nacb e córtex pré-frontal, áreas com conexões recíprocas com a CeA, sugerindo a importância do estado fisiológico e do aprendizado nos mecanismos de recompensa (ROBINSON e BERRIDGE, 2013). A CeA recebe projeções de vias neurotransmissoras de áreas diretamente envolvidas com este comportamento, como o AV3V, o SFO e o LPBN, bem como da AP e do NTS que recebem as informações viscerais vindas da periferia (TANAKA et al., 1998; GEERLING et al., 2006; MENANI, 2014). Corroborando nosso dado, verifica-se que o tratamento com injeções periférica de LPS ou IL-1 $\beta$  induz a expressão de c-Fos na CeA (DAYAS et al., 2001; FROST et al., 2001; KONSMAN et al., 2008), além disso, observa-se que o receptor  $\text{IL-1R}$  é expresso na amígdala em condições basais (FROST et al., 2001).

## **10.2 Participação do sistema serotoninérgico central na resposta antinatriorexigênica da IL-1 $\beta$ na CeA ou na MeA de ratos depletados de sódio**

Neste estudo observamos que a depleção central de serotonina, por ação p-CPA, na concentração 200  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ , via microinjeção no VL, impede o efeito antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$  na maior concentração de 1,6ng/0,2 $\mu\text{l}$  em ratos depletados de sódio, tanto na CeA quanto na MeA. Observamos também que a depleção encefálica de serotonina não modifica a ingestão de salina hipertônica nos grupos tratados com microinjeções de salina isotônica na CeA ou na MeA, quando comparados com os grupos sem depleção encefálica de serotonina também tratados com microinjeções de salina isotônica na CeA ou na MeA. Como esperado os grupos com depleção encefálica de serotonina e depletados de sódio, não apresentam ingestão de água significativa durante o curso das sessões experimentais

Diversos estudos têm demonstrado a modulação da IL-1 $\beta$  sobre a neurotransmissão monoaminérgica central (SHINTANI, et al., 1993), outros estudos mostram que o desequilíbrio das monoaminas centrais promove alterações comportamentais observadas em indivíduos deprimidos (DELGADO, 2000). Verifica-se que ratos tratados com LPS ou IL-1 $\beta$ , apresentam aumento dos níveis de serotonina e triptofano em todo encéfalo, sendo mais evidente no Nacb, no hipotálamo, no hipocampo e no córtex pré-frontal (DUNN, 1992; 2006; SONG et al., 1999; MERALI et al., 1997). Goshen e colaboradores (2008) observaram que camundongos com depressão induzida por estresse crônico apresentam níveis aumentados de IL-1 e que os animais *knockout* para IL-1RA (IL-1RA<sup>-/-</sup>), consomem avidamente solução de sacarose, apresentaram atividade exploratória e não apresentaram hiperativação do eixo HHA. Observa-se também que IL-1 $\beta$  é um potente regulador da expressão do transportador de serotonina (SERT), e que a ação estimulatória desta citocina não está associada a alterações nos níveis celulares de AMP cíclico. Este dado indica que a IL-1 $\beta$  pode regular positivamente a expressão dos transportadores de serotonina (RAMAMOORTHY et al., 1995). A serotonina, assim como a IL-1 $\beta$ , e está envolvida em uma miríade de funções de controle central, como a ativação ao eixo HHA, homeostasia cardiovascular e o apetite por sódio (SCHIEPERS et al., 2005; FERREIRA et al., 2005; CP LUZ et al., 2006; 2007).

Os indícios de como IL-1 $\beta$  atua sobre o apetite por sódio são poucos. É possível que esta citocina iniba uma via estimulatória ou ative uma via inibitória de controle deste comportamento. Diante da modulação desta citocina sobre os níveis de serotonina central e a notória participação deste neurotransmissor sobre o apetite por sódio, investigamos o possível envolvimento do sistema serotoninérgico central sobre o efeito antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$ . A coordenação do sistema serotoninérgico central sobre a homeostasia hidrossalina é vastamente estudada na literatura, de modo que mediação deste neurotransmissor, por seus diferentes receptores, é evidente nos mecanismos da sede e apetite por sódio (CASTRO et al., 2000; 2002; 2003; MENANI et al., 1995; 2014). A ampla utilização de drogas agonistas e antagonistas, específicas ou não para os diferentes tipos de receptores de serotonina, nos permitem entender a participação das vias serotoninérgicas centrais sobre a homeostasia hidrossalina.

A depleção de serotonina é uma técnica eficiente para o estudo das diversas funções em que esta indolamina está envolvida. Pesquisadores utilizam da técnica para

investigar a ação da serotonina sobre o apetite por sódio, no entanto, muitos deles fazem o uso do p-CPA por injeções periféricas, sendo este um modelo clássico de hipofunção serotoninérgica (COOPER et al., 1996; LIMA et al., 2003; REIS, 2006; 2007). Alternativamente a estes estudos, adaptamos a técnica para injeções diretamente no encéfalo, pelos ventrículos cerebrais, possibilitando adifusão do fármaco por todo o SNC, de modo a restringir a depleção ao encéfalo, uma vez que a serotonina está envolvida em muitas funções periféricas. O p-CPA é um fármaco neurotóxico eficiente na redução dos níveis de 5-HT e do seu metabólito, 5-HIAA. Inibe a conversão da serotonina por bloquear, de forma irreversível a ação da triptofano hidroxilase (REIS, 1994). Este procedimento reduz a disponibilidade de 5-HT, assim sendo, compromete a neurotransmissão serotoninérgica por dias, até que seja normalizada, quando há nova síntese da enzima triptofano hidroxilase (CHAPUT et al., 1990; LIMA et al. 2004). Esta técnica reduz de 90% a 95% a 5-HT no SNC (REIS, 2007). Verifica-se que o tratamento periférico com p-CPA promove diminuição rápida da enzima triptofano hidroxilase no núcleo dorsal da rafe (DRN), região onde estão localizados os núcleos dos neurônios serotoninérgicos, e dois dias após a injeção do fármaco, não se observa a expressão desta enzima (RICHARD et al., 1990). Observa-se que a depleção de 5-HT por tratamento periférico de p-CPA aumenta a ingestão de salina hipertônica tanto em ratos normonatremicos quanto em depletados de sódio (LIMA et al., 2003; REIS, 2006). Observar-se também que a depleção central de serotonina promove a regulação positiva dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> e aumento da ativação pós-sináptica (FIORELLA et al., 1995), bem como que a ativação de receptores 5-HT<sub>2C</sub> com o mCPP, modula o apetite de sódio induzido de depleção deste íon em ratos com hipotireoidismo (BADAUÊ-PASSOS et al., 2003). Outro método para o estudo do sistema serotoninérgico central é a lesão dos núcleos da rafe, no entanto escolhemos a administração i.c.v. de p-CPA por ser uma técnica segura de indução da hipofunção serotoninérgica, além disso, a lesão dos núcleos da rafe poderia comprometer a integridade de vias colinérgicas e dopaminérgicas que passam pelo mesencéfalo.

A amígdala recebe massivas projeções de axônios serotoninérgicos dos núcleos DRN e MRN (Azmitia, 1991). Ao investigar o efeito da lesão eletrolítica no DRN, observou-se diminuição abrupta dos níveis de ANP e expansão do volume sanguíneo de ratos normovolêmicos (REIS et al., 1994). Observa-se também em ratos depletados de sódio por diálise pritoneal que a lesão no DRN promove ativação de neurônios do NTS, SFO, OVLT e MnPO (FRANCHINI et al., 2002). O MnPO, o SFO, o OVLT, o PVN, o LPBN, o NTS e a AP enviam e recebem projeções para o DNR (MENANI e JOHNSON, 1995; AZMITIA,



2001; HOYER et al., 2002). A CeA e a MeA recebem projeções de neurônios serotoninérgicos do LPBN, compondo uma via inibitória para o apetite por sódio (MENANI et al., 1996). Verifica-se que microinjeção de metisergida no PBN aumenta a ingestão de água em ratos desidratados e a ingestão de salina hipertônica em ratos depletados de sódio e o pré-tratamento com DOI, agonista dos receptores 5-HT<sub>2</sub> diminui a ingestão de salina hipertônica nos ratos depletados de sódio (MENANI et al., 1996; 1998). Sugere-se que a ação inibitória da serotonina no PBN sobre o apetite por sódio seja sobre a ação da ANGII (MENANI et al., 2014). A AP, o NTS e o LPBN apresentam conexões serotoninérgicas recíprocas e formam um circuito inibitório ao apetite por sódio (MENANI, 2014). Esses dados corroboram a integração entre as áreas do prosencéfalo e do mesoencéfalo no controle do apetite por sódio.

Dados da literatura mostram a vasta distribuição dos receptores de serotonina pelo encéfalo, incluindo a CeA e a MeA, que apresentam elevada expressão de receptores de serotonina dos tipos 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2C</sub>, e 5-HT<sub>3</sub> (BARNES e SHARP, 1999; CLEMENT et al., 2000; GIORGETTI e TECOTT, 2004). Verifica-se que ratos depletados de sódio apresentam ativação neuronal em áreas envolvidas no circuito da motivação e recompensa como o Nacb, a CeA e o BST (NA et al., 2007., GRONDIN et al., 2011). Dados do laboratório de Neurociências (ICS/UFBA) evidenciam a ação inibitória da serotonina no apetite por sódio de ratos depletados deste íon. LUZ e colaboradores (2006; 2007) observaram que microinjeções do agonista mCPBG na CeA e MeA inibe o apetite por sódio. No entanto, microinjeções do mCPP, agonista dos receptores 5HT<sub>2B/2C</sub>, na MeA ou na CeA, não altera o apetite por sódio. O bloqueio dos receptores 5HT<sub>2B/2C</sub> com a administração de o antagonista específico SDZ SER 082 na MeA, reduz significativamente a ingestão de salina hipertônica, enquanto a administração deste antagonista na CeA não promove alterações no apetite por sódio. Estes resultados são conclusivos em afirmar que a serotonina pode modular o apetite por sódio gerando uma resposta inibitória ao atuar em receptores 5HT<sub>3</sub>, seja na MeA ou na CeA. Além disso, sugerem que a integridade dos receptores 5HT<sub>2B/2C</sub> da MeA são importantes para a regulação do apetite por sódio.

### **10.3 Efeitos da IL-1 $\beta$ na CeA ou na MeA sobre o hedonismo e atividade locomotora de ratos depletados deste sódio.**

A redução da atividade exploratória/ locomotora, bem como a aversão ou neutralidade a substâncias palatáveis, são manifestações comportamentais comuns a indivíduos doentes e apresentadas após o tratamento de LPS ou IL-1 $\beta$ , bem (MCCARTHY et al., 1985; RW JOHNSON; 1998; KELLEY et al., 2002; KONSMAN et al., 2008; BONSALL et al., 2015). Verifica-se que apresentam diminuição na atividade exploratória após tratamento periférico com IL-1 $\beta$  ou LPS (BONSALL et al., 2015; ZHANG et al., 2016). Verifica-se também que após tratamento periférico com IL-1 $\beta$  apresentam redução da ingestão dieta rica em sacarina e ao oferecer esta dieta junto com dieta balanceada normal, a redução da ingestão é mantida; ainda neste estudo, um novo sabor é adicionado à dieta e após o tratamento com IL-1 $\beta$ , o comportamento aversivo e hipofágico se mantiveram. Estes resultados indicam que, sob certas condições, a IL-1 $\beta$  pode induzir uma aversão ao sabor e ao sabor do alimento consumido (BAUER et al., 1995).

Diferente do observado na literatura, quando se mimetiza condições de doenças por administração da IL-1 $\beta$ , verificamos neste estudo que o efeito antinatriorexigênico observado após microinjeção desta citocina na concentração de 1,6 ng/0,2 $\mu$ l, na CeA ou na MeA 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. Alternativamente ao teste do campo aberto, investigamos também se efeito antinatriorexigênico observado neste estudo é devido a supressão geral e inespecífica do comportamento ingestivo no SNC. O nosso dado mostra que em ratos desidratados por 24 horas, além de não haver inibição da ingestão de sacarina 0,1% (altamente palatável), há uma preferência na ingestão desta solução em relação a água filtrada tanto na CeA quanto na MeA logo a inibição da ingestão de salina hipertônica por ação da IL-1 $\beta$ , na dose 1,6 ng na CeA ou na MeA foi específica para o apetite por sódio e não prejudicou a manifestação do comportamento hedônico.

#### **10.4 Efeito hipertérmico da IL-1 $\beta$ na CeA ou na MeA de ratos depletados de sódio.**

Microinjeções de IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA promove aumento da temperatura corporal em ratos depletados de sódio. Verificamos aumento discreto da temperatura cinco minutos após a injeção e aumento hipertermia máxima aos 60 minutos. Ao final do experimento, observamos queda discreta na temperatura, embora o efeito hipertérmico ainda persistisse. Como esperado, o tratamento com salina isotônica na CeA e na MeA não promove aumento na temperatura. Ao comparamos a hipertermia induzida pela IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA, constatamos que na MeA a IL-1 $\beta$  foi mais eficiente na resposta hipertermica que a CeA.

A Febre durante o curso da infecção/ inflamação é desencadeada pela ação de citocinas no SNC e é um mecanismo adaptativo do organismo na tentativa de eliminar o patógeno (LUESHI et al., 1996; ZETTERSTON et al., 1998; NETEA et al., 2000; DINARELLO, 2015). Febre, ao contrário de hipertermia, compreende um aumento regulado da temperatura corporal devido mudanças nos mecanismos da perda e ganho de calor, como consequência de mudanças no *set-point* termorregulador (CABANAC e MASSONNET, 1974). Durante a infecção e inflamação a IL-1 $\beta$  acessa o SNC e ativa os CVOs, induzindo a síntese de prostaglandinas, que são os mediadores centrais das respostas coordenadas que conduzem a febre (NETEA et al., 2010), bem como pode ativar células endoteliais e perivasculares da barreira hematoencefálica e desencadear a síntese dos mediadores da febre (LUHESHI, 1998). Estudos demonstram a importância da síntese de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) na hipertermia ou febre induzida por LPS ou IL-1 $\beta$ . A deleção de genes que codificam a PGE<sub>2</sub> e seus receptores comprometem a síntese de enzimas sintetizadoras da PGE<sub>2</sub> como fosfolipases, ciclooxigenase-1 (Cox-1) e ciclooxigenase (Cox-2), outras prostaglandinas e eicosanóides (ROMANOVSKY et al., 2005; DAMM et al., 2012). Dados da literatura mostram que a IL-1 $\beta$  pode estimular a síntese de PGE<sub>2</sub> e ativar os receptores de prostaglandina tipo 3 (EP3R) no SFO, no OVLT e MnPO e desencadear a febre (LAZARUS et al., 2006; 2007; NAKAMURA, 2011). As vias efetoras para febre começam por neurônios do MnPO que expressam os EP3R. Estes neurônios se projetam para a rafe pálida, onde neurônios simpáticos pré-motores que dirige a termogênese na gordura marrom e vasoconstrição são localizados (ROMANOVSKY et al., 2005). Em estudo recente, mostramos que a ratos depletados de sódio que recebem microinjeção de IL-1 $\beta$  no MnPO ou SFO

apresentam aumento da temperatura corporal (CERQUEIRA et al., 2016), confirmando o envolvimento destas áreas na resposta de febre, verifica-se que a febre induzida por injeção periférica de LPS é atenuada por microinjeção do antagonista IL-1RA no SFO (CARTMELL et al., 1999).

A IL-1 $\beta$  pode ativar neurônios das áreas encefálicas envolvidas diretamente com a termorregulação, como a área pré-óptica (POA) e outras áreas hipotalâmicas (KLIR et al., 1998; BOULANT, 2000). O MnPO e os núcleos do hipotálamo apresentam conexões com a CeA e com a MeA (JOHNSON, 1999; CHOI et al., 2005). Boulant (2000) sugere que a área pré-óptica e a região do hipotálamo atuam como integradores de sinais vindos de áreas efetoras localizadas no tronco cerebral e a medula, de modo que a regulação da temperatura é controlada por uma hierarquia de áreas encefálicas. Neurônios simpáticos pré-motores da medula, envolvidos na termorregulação são controlados por estruturas encefálicas superiores como o hipotálamo dorsomedial (DMH), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), substância cinzenta peraqueductal (PAG), área tegmentar ventral e *locus coeruleus* (LC) (BAMSHAD et al., 1999; OLDFIELD et al., 2002; CANO, 2003). Através destas vias, neurônios termofetores são controlados relativamente de forma independente (MCALLEN, 2004), bem como as vias podem ser acionadas para desencadear uma resposta termorreguladora frente a um estímulo específico (HORN et al., 1994). Verifica-se que o PVN e o LC medeiam a produção de calor induzida por LPS e PGE<sub>2</sub> (HORN et al., 1994; M ALMEIDA et al., 2004).

A sinalização inflamatória e as vias termofetoras envolvidas na febre e hipotermia são moduladas por neuropeptídeos e hormônios peptídicos (ROMANOVSKY et al., 2005). Busbridge e colaboradores (1989) sugerem que IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estimulam febre por mecanismos diferentes, visto que o pré-tratamento com o antagonista do hormônio liberador da corticotropina (CRH) inviabiliza a febre produzida por IL-1 $\beta$ , mas não altera a resposta febril da IL-1 $\alpha$ , sugerindo que o CRH medeia a termogênese induzida por IL-1 $\beta$ , mas não por IL-1 $\alpha$ . Horn e colaboradores (1994) sugerem que a ação pirética do CRH seja por ativação dos neurônios sensíveis a este hormônio no PVN, bem como a mediação da febre induzida por PGE<sub>2</sub> e LPS. Contudo, há indícios que o CRH também pode atuar como antipirético. Verifica-se que em coelhos com febre induzida por pirógenos de leucócitos tratados com CRH i.c.v. há diminuição da temperatura corporal (BERNADINI et al., 1984).

A participação da amígdala nas respostas emocionais relacionada ao estresse é notória e vastamente discutida na literatura (GRAY, 1993; GRAY e BINGAMAN, 1996). Muitos estudos mostram que a IL-1 $\beta$  pode modular a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e que este eixo está hiperresponsivo no estresse (SAPERTEINS et al., 1992; VAN DER MEER et al., 1996; GADEK-MICHALSKA et al., 2011). Verifica-se que o tratamento periférico com IL-1 $\beta$  promove síntese de CRH no PVN, aumento nos níveis plasmáticos de ACTH e aumento na secreção de corticosterona e que lesão no PVN inviabiliza a secreção de ACTH induzida por IL-1 $\beta$ . Além disso, o tratamento com indometacina, anti-inflamatório não esteróide, inibidor da Cox-1 e Cox-2, reverte parcialmente o efeito induzido pela IL-1 $\beta$ , sugerindo o aumento da síntese de prostaglandinas desempenha algum papel nesta ativação (RIVIER e RIVEST, 1993).

Os sinais relacionados ao “comportamento doentio”, dentre eles a febre, desencadeados durante o estresse são mediados pela IL-1 $\beta$  (KOSNANN et al., 2002). A CeA e a MeA integram o circuito endógeno do CRH que medeia mudanças neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais em resposta ao estresse (GRAY e BINGAMAN, 1996), bem como apresentam elevada densidade de receptores para CRH e glicocorticoides. Os neurônios de CRH da amígdala se projetam para várias áreas encefálicas como o BNST, o hipotálamo lateral (HL), PAG, DNR, LPBN e NTS (GRAY, 1993; GRAY e BINGAMAN, 1996). Segundo Lee e colaboradores (1998), a sinalização da IL-1 $\beta$  periférica ao SNC mediando a secreção de ACTH e CRH, supostamente seja via NTS e AP, visto que os ratos com AP intacta apresentam aumento nos níveis destes hormônios e elevada expressão de c-Fos no NTS, no PVN, na CeA e no BNST, enquanto os ratos com remoção da AP apresentam diminuição dos níveis de ACTH e CRH. Diante das evidências da viabilidade dos hormônios do estresse em induzir hipertermia, não descartamos a possibilidade do efeito hipertérmico observado no presente estudo seja mediado pelo CRH ou síntese de PGE<sub>2</sub> e sugerimos que a MeA é mais sensível a estes mediadores que a CeA, no entanto é necessário investigar com mais detalhe o mecanismo envolvido.

Em síntese, nossos dados demonstram pela primeira vez efeito direto da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA, áreas do parênquima encefálico, na inibição do apetite por sódio de ratos depletados deste íon, sendo a CeA mais sensível que a MeA na inibição do apetite por sódio. O efeito antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$  é dependente da integridade do sistema serotoninérgico central. Além disso, é evidente que a inibição do apetite por sódio é específica para este

comportamento e não está relacionada com alguma inabilidade locomotora ou de exploração do ambiente, ou efeito anedônico. Nossos resultados mostram também o efeito hipertérmico desta citocina na CeA e na MeA, sendo que para este parâmetro a MeA é mais sensível a ação da IL-1 $\beta$ , contudo é necessário investigar mais detalhadamente para estabelecer os mecanismos de ação. Sugerimos que o efeito antinatriorexigênico e hipertérmico da IL-1 $\beta$  na CeA e na MeA sejam eventos independentes desde que a inibição do apetite por sódio é observado desde os cinco minutos iniciais enquanto o efeito hipertermico mais diretamente aos 60 minutos.

## 11 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS

Estudos do laboratório de neurociências evidenciaram o envolvimento da IL-1 $\beta$  na homeostasia hidrossalina, primeiramente investigando as possíveis áreas periventriculares envolvidas (DE CASTRO E SILVA, 2006; PA LUZ et al., 2006, 2009), em áreas encefálicas importantes para o controle da sede e do apetite por sódio como SFO, MnPO (CERQUEIRA et al., 2016) e as áreas investigadas no presente estudo, CeA e MeA. Estes dados mostram a mediação dos sistemas opioidérgico e serotoninérgico central nos efeitos antidipsogênico e antinatriorexigênico da IL-1 $\beta$ . Contudo, diante dos dados obtidos, nosso objetivo é investigar quais receptores e vias serotoninérgicas estão envolvidas na resposta obtida neste estudo. A serotonina e a dopamina são neurotransmissores envolvidos no comportamento ingestivo como também nos mecanismos de recompensa e a IL-1 $\beta$  está envolvida na anedonia de indivíduos que manifestam o comportamento doentio (DANTZER et al., 2009), de modo que podemos complementar os resultados obtidos investigando a reatividade ao sabor salgado, com microinjeções desta citocina na CeA e na MeA, utilizando para isto o teste de palatabilidade.

A febre e a IL-1 $\beta$  também está envolvida na febre e na hiperativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. (DANTZER et al., 2009) No presente estudo não pesquisamos os possíveis mecanismos de ação da hipertermia observada, sendo este um dos objetivos futuros, investigando por exemplo o envolvimento das vias da Cox-1 e Cox-2. Além disso, sabendo que em situações de estresse há ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e o envolvimento da amígdala em transtornos de natureza psíquica (SACHDEV et al., 2007), existe a possibilidade de investigar o envolvimento desta citocina nos transtornos de ansiedade e depressão, utilizando para isto os testes da cruz elevada e do nado forçado.

Sabe-se que a IL-1 $\beta$  modula a de outros neurotransmissores como por exemplo, a dopamina, também envolvida no comportamento ingestivo, nos mecanismos de recompensa e na depressão maior (GOSHEN et al., 2008) sendo assim não se exclui a possível mediação do sistema dopaminérgico central nos efeitos homeostáticos da IL-1 $\beta$ , sendo esta uma possível hipótese a ser testada.

## 12 REFERÊNCIAS

- AFONINA, I. S. et al. Proteolytic processing of Interleukin-1 family cytokines: variations on a common theme. **Immunity**, v. 42, p. 991–1004, 2015.
- AKHABIR, L., SANDFORD, A. Genetics of interleukin 1 receptor-like 1 in immune and inflammatory diseases. **Curr. Genomics**, v. 11, p. 591-606, 2011
- ALLAN, S.M, ROTHWELL, N.J. Inflammation in central nervous system injury. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.B.** v. 358, p.1669–1677, 2003.
- ALLAN, S.M. Interleukin-1 and neuronal injury. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p.829-840, 2005.
- ALMEIDA, M. C. Thermoeffector neuronal pathways in fever: a study in rats showing a new role of the locus coeruleus. **J. Physiol.**, v. 558, n.1, p.283-294, 2004.
- ALMEIDA, R.L. et al. Inhibition of sodium appetite by lipopolysaccharide: involvement of alpha2- adrenoceptors. **Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.**, v. 301, p.185–192, 2011a.
- ALMEIDA, R.L. et al. Lipopolysaccharide reduces sodium intake and sodium excretion in dehydrated rats. **Physiol Behav.**, v.102, p. 164–169, 2011b.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol. Rev.**, v. 84, n. 1, p. 169-208, 2004. **Autonomic Nervous System**. v. 62, p.72–78, 1997.
- AREND, W.P.; GUTHRIDGE, C. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist. **Ann Rheum. Dis.**, v.59, n.1, Suppl 1, p.60-64, 2000.
- AVRITH, D.B.; FITZSIMONS, J.T. Increased sodium appetite in the rat induced by intracranial administration of components of the renin-angiotensin system. **J. Physiol.**, v. 301, p.349-364, 1980.
- AVRITH, D.B.; FITZSIMONS, J.T. Renin-induced sodium appetite: effects on sodium balance and mediation by angiotensin in the rat. **J. Physiol.**, v. 337, p.479-496, 1983.



AZMITIA E.C, WHITAKER-AZMITIA P.M. Handbook of experimental pharmacology: Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. In Baumgarten HG, Gothert M (eds), **Development and Neuroplasticity of Central Serotonergic Neurons**, pp 1–39, 1997.

AZMITIA, E.C. Serotonin neurons, neuroplasticity and homeostasis of neural tissue. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 33–45, 1999.

AZMITIA, E.C., SEGAL, M. An Autoradiographic Analysis of the Differential Ascending Projections of the Dorsal and Median Raphe Nuclei in the Rat. **J. Comp. Neur.**, v.179, p. 641-668, 1978.

BADAUE-PASSOS, D.J.R. et al. Effect of brain serotonergic stimulation on sodium appetite of ethyroid and hypothyroid rats. **Exp. Physiol.**, v. 88, n. 2, p. 251-260, 2003.

BAMSHAD, M. et al. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. **Am. J. Physiol.**, v, 276, n, 6. p. 1569-1578, 1999.

BAN, E. et al. Receptors for interleukin-1 ( $\alpha$  and  $\beta$ ) in mouse brain: Mapping and neuronal localization in hippocampus. **Neuroscience**, v. 43,n.1, p. 21-30, 1991.

BANKS, W.A. Blood-Brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. **Curr. Pharmaceut. Design**, v. 11, n.8, p. 973-984, 2005.

BANKS, W.A. et al. Passage of cytokines across the blood-brain Barrier. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, p. 241-248, 1995.

BARNES N. M.; SHARP T.A. review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1083–1152, 1999.

BENVENISTE, E.N. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. **A J Physiol. - Cell Physiol.**, v.263, n. 1, p.1-16, 1992.

BERRIDGE K. C. et al. Liking, wanting, and learning. **Curr.Opin.Pharmacol.**, v.9, p.65–73, 2009.

BERRIDGE, K.C. et al. Dissecting components of reward: ‘liking’, ‘wanting’, and learning. **Curr.Opin.Pharmacol.**, v. 9, n.1, p. 65–73, 2009.

BLACKBURN, R.E. et al. Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 263, n.6, p. 1347-1353, 1992a.

BLACKBURN, R.E. et al. Central oxytocin mediates inhibition of sodium appetite by naloxone in hypovolemic rats. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 2, p.255-263, 1992b.

BOROVIKOVA, L.V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p.458-462, 2000.

BOUGHTER, J.R.; BACHMANOV, A.A. Behavioral genetics and taste. **BMC Neuroscience**, v.S38, Suppl 3, 2007.

BOURQUE, C.W. Central mechanism of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat.Rev. Neurosci.**, v. 9, n. 7, p. 519-531, 2008.

BRET-DIBAT, J. L. et al. Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism. **Brain Behav Immun.**, v. 9, n.3, p. 242-246, 1995.

BUCINSKAITE, V. et al. Interleukin-1b sensitizes the response of the gastric vagal afferent to cholecystokinin in rat. **Neuroscience Letters**, v. 229, p. 33–36, 1997.

BUCINSKAITE, V. et al. Interleukin-1b sensitizes the response of the gastric vagal afferent to cholecystokinin in rat. **Neurosci.Lett.**, v. 229, p. 33–36, 1997.

BUHOT, M.C. et al. Role of serotonin in memory impairment. **Ann. Med.**, v. 32, p. 210-221, 2000.

BUNDZIKOVA, J. et al. Response of substances co-expressed in hypothalamic magnocellular neurons to osmotic challenges in normal and Brattleboro rats. **Cell. Mol.Neurobiol.**, v. 28, n.8, 1033-1047, 2008.

BYKOWSKI, M.R. et al. Regulation of NaCl solution intake and gastric emptying in adrenalectomized rats. **Physiol.Behav.**, v. 92, n. 5, p.781-789, 2007.

CALAPAI, G. et al., Interleukin-1 inhibits drinking behaviour through prostaglandins, but not by nitric oxide formation. **Life Sci.**, v. 60, 457–464, 1997.

- CANO, G. A. M. et al. Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. **J. Comp. Neurol.**, v. 460, n. 3, p. 303-326, 2003.
- CARTMELL, T. et al. Circulating interleukin (IL)-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. **J.Physiol.**, v. 526, p.653-661, 2000.
- CASTRO L. et al. Central 5-HT4 receptors and drinking behavior. **Pharmacol.Biochem.Behav.**, v. 66, p.443-8, 2000.
- CASTRO, D.C., BERRIDGE, K.C. Advances in the neurobiological bases for food 'liking' versus 'wanting'. **Physiol.Behav.**, p.22-30, 2014.
- CASTRO, L. et al. Central 5-HT2B/2C and 5-HT3 receptor stimulation decreases salt intake in sodium-depleted rats. **Brain Research**, v. 981, p. 151-159, 2003.
- CAVALCANTI-LIMA, H.R. et al. Dipsogenic stimulation in ibotenic DRN-lesioned rats induces concomitant sodium appetite. **Neurosci.Lett.**, v. 374, n. 1, p. 5-10, 2005.
- CERQUEIRA, D.R. et al. Effects of interleukin-1 beta injections into the subfornical organ and median preoptic nucleus on sodium appetite, blood pressure and body temperature of sodium-depleted rats. **Physiol.Behav.**, v. 163. P. 149-160, 2016.
- CHAI, Z. et al. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. **J. Exp. Med.**, v. 183, n.1, p. 311-316, 1996.
- CHIARAVIGLIO, E.; PÉREZ GUAITA, M.F. The effect of intracerebroventricular hypertonic infusion on sodium appetite in rats after peritoneal dialysis. **Physiol.Behav.**, v. 37, n.5, p. 695-659, 1986.
- CLAPHAM, J.C. Central control of thermogenesis. **Neuropharmacology**, v. 30, p.1-13, 2011.
- CONTRERAS, R.J.; STETSON, P.W. Changes in salt intake lesions of the area postrema and the nucleus of the solitary tract in rats. **Brain Res.** v. 211, n. 2, p. 355-366, 1981.
- COPPACK, S.W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 60, n. 3, p. 349-356, 2001.

- CRAGNOLINI, A. B. et al.  $\alpha$ -MSH and  $\gamma$ -MSH modulate early release of hypothalamic PGE2 and NO induced by IL-1 $\beta$  differently. **Neurosci. Lett.**, v. 409, n.3, p. 168-172, 2006.
- CREWS, E.C.; ROWLAND, N.E. Role of angiotensin in body fluid homeostasis of mice:effect of losartan on water and NaCl intakes. **Am. J. Physiol.Regul.Integr. Comp. Physiol.**, v. 288, p. 638-644, 2005.
- CROSS-MELLOR, S.K. et al. Examining the effects of lipopolysaccharide and cholecystinin on water ingestion: comparing intake and palatability. **Brain Res.**, v. 86, p.220-232, 2000.
- CROWLEY, S.D., JEFFS, A.D. Targeting cytokine signaling in salt-sensitive hypertension. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 311, p. 1153–1158, 2016.
- CURFS,J.H. et al.A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin.Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p 742-780, 1997.
- DAMM, J. Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the Toll-like receptor 7 agonist imiquimod. **Neuroscience**, v. 10, n. 201, p. 166-183, 2012.
- DANIELS, D.; FLUHARTY, S.J. Salt appetite: a neurohormonal view point. **Physiol. Behav.**, v.81. p. 319-337, 2004.
- DANTZER, R. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Immunol. Allergy Clin. North Am.**, v. 29, n. 2, p., 2009.
- DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 9, n. 1, p. 46–56, 2008.
- DAY, H.E.; AKIL, H. Differential pattern of c-fos mRNA in rat brain following central and systemic administration of interleukin-1-beta: implications for mechanism of action. **Neuroendocrinology**, v. 63, n. 3, p.207-218, 1996.
- DE CASTRO E SILVA,E. et al. 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.**, v. 83, p. 285–295, 2006.

DE LUCA JR, L.A. et al. Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiol. Behav.**, v. 100, p. 535-544, 2010.

DE LUCA JR, L.A. et al. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 282, p.552-559, 2002.

DE LUCA JR. L.A et al. Participation of  $\alpha 2$ -adrenoceptors in sodium appetite inhibition during sickness behaviour following administration of lipopolysaccharide. **J. Physiol.**, v. 594, n.6, p. 1607–1616, 2016.

DE LUCA JR, L.A. The anteroventral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. **Brain Res. Bull.**, v. 28, n.1, p.73-87, 1992.

DELGADO, P.L. Depression: the case for a monoamine deficiency. **J. Clin. Psych.**, v. 61, n.6, p, 7-11, 2000.

DENTON, D.A. et al. Hypothalamic integration of body fluid regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, n.14, p.:7397-7404, 1996.

DIANA, A. et al., 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. **Neuroscience**, v. 89, p. 137–147, 1999.

DINARELLO, C.A. The history of fever, leukocyticpyrogen and interleukin-1. **Temperature**, v. 2, n.1, p. 8-16, 2015.

DINARELLO, C.A. A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, p. 1203–1217, 2011.

DINARELLO, C.A. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. **Blood**, v. 87, n.6, p. 2095-2147, 1996.

DINARELLO, C.A. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. **Blood**, v.87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, p. 3720–3732, 2011b.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory Cytokines. **Chest**, v. 118, n.2, p. 503-508, 2000.

DINARELLO, C.A., WOLF, S.M. The Role of Interleukin-1 in Disease. **New Engl. J. Med.**, v.328, p. 106-113, 1993.

DINARELLO, CA. The biological properties of interleukin-1. **Eur. Cytokine Netw.**, v.5, n.6, p.517-531, 1994.

DUNN, A.J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clin. Neuroscience Res.**, v. 6, p. 52–68, 2006.

EDDAHIBI, E. et al. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. **J Clin Invest**. V.108, p. 1141-1150, 2001.

EK, M. et al. Inflammatory response: Pathway across the blood–brain barrier. **Nature**, v. 410, p. 430-431, 2001.

ELMQUIST, J.K. et al. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. **J. Comp. Neurol.**, v.371, p. 85–103, 1996.

ENGELHARDT, B. Development of the blood-brain barrier. **Cell Tissue Res.**, v. 14, n.1, p.119-129, 2003.

EPSTEIN, A.N.; STELLAR, E. The control of salt preference in the adrenalectomized rat. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 48, p. 167-172, 1955.

ERICSSON, A. et al. Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: Distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1–induced cellular activation. **J. Comp. Neurol.**, v. 361, n. 4, p.681-698, 1995.

FARRAR, W.L. et al. Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. **J. Immunol.**, v. 139, n. 2, p. 459-463, 1987.

FELGER, J.C.; LOTRICH, F.E. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. **Neuroscience**, v. 246, p. 199–229, 2013.

- FERREIRA, H. S. et al. Role of central 5-HT<sub>3</sub> receptors in the control of blood pressure in stressed and non-stressed rats. **Brain Res.**,v.1028, p.48–58, 2004.
- FINCK, B.N.; JOHNSON, R.W. Anorexia, weight loss and increased plasma interleukin-6 caused by chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1beta in the rat.**Brain Res.**,v. 761, n.2, p.333-337, 1997.
- FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, Thirst and Sodium Appetite. **Physiol. Rev.**,v. 78, p. 583-686, 1998.
- FLUHARTY, S.J.; EPSTEIN, A.N.Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids.**Behav.Neurosci.**, v. 97, n.5, p.746-758, 1983.
- FLYNN, F.W. et al. Central gustatory lesions: II. Effects on sodium appetite, taste aversion learning, and feeding behaviors.**Behav.Neurosci.**, v.105, n. 6, p.944-954, 1991.
- FORMENTI, S. et al. Functional evidence of hindbrain mechanism for aldosterone-induced sodium appetite.**Appetite**, v. 52, p.832, 2009.
- FRANCHINI, L.F. et al. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. **Am. J. Physiol.**,v. 282., n. 1, p. 235-243, 2002.
- FROST, P. et al.IL-1 receptor type I gene expression in the amygdala of inflammatory susceptible Lewis and inflammatory resistant Fischer rats. **J. Neuroimmunol.**,v.121,n. 3,p.32-39, 2001.
- GADEK-MICHALSKA, A. et al.Effect of prior stress on interleukin-1 $\beta$  and HPA axis responses to acute stress. **Pharmacol.Rep.**, v. 63, p. 1393-1403, 2011.
- GALAVERNA, O. et al. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res. Bull.**, v. 28, p.89–98, 1992..
- GALEA, I. et al. What is immune privilege (not)?.**Trends Immunol.**, v. 28, p. 12–18, 2007.
- GARCÍA-BUENO, B. et al. Cerebrovascular cyclooxygenase-1 expression, regulation, and role in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by inflammatory stimuli.**J. Neurosci.**, v. 29, n. 41, p.12970-12981, 2009.

- GARLANDA, C. et al. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003-1018, 2013.
- GEERLING, J. C. et al. Aldosterone-sensitive neurons in the rat central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, v. 494, p. 1167-1176, 2006b.
- GEERLING, J.C. et al. Aldosterone Target Neurons in the Nucleus Tractus Solitarius Drive Sodium Appetite. **J. Neurosci.**, v. 26, n.2, p.411–417, 2006.
- GEERLING, J.C.; LOEWY, A.D. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: efferent projections. **J. Comp. Neurol.**, v. 497, p. 223–250, 2006.
- GEERLING, J.C.; LOEWY, A.D. Central regulation of sodium appetite. **Exp. Physiol.**, v. 93, p. 178-209, 2008.
- GOBBI J. et al. Activation of serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the lateral parabrachial nucleus increases NaCl intake. **Brain Res.**, v.1066, p.1–9, 2005.
- GOEHLER, L.E. et al. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **J. Neurosci.**, v. 19, n. 7, p. 799-806, 1999.
- GOLDIN, A.L. et al. Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 365–368, 2000.
- GOLDSTEIN, D.S. Adrenal responses to stress. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 30, n.8, p.1433-1440, 2010.
- GOSHEN, I. et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. **Mol. Psych.**, v. 13. n.7, p. 717-728, 2008.
- GREENWOOD, M.P. et al. Salt appetite is reduced by a single experience of drinking hypertonic saline in the adult rat. **PLoS One**, v. 9, n.8, p.1-10, 2014.
- GROB, M. et al. Characterization of the neurochemical content of neuronal populations of the lamina terminalis activated by acute hydromineral challenge. **Neuroscience**, v. 122, n.1, p. 247-257, 2003.



HANSEN, M.K. et al. Vagotomy Blocks the Induction of Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA in the Brain of Rats in Response to Systemic IL-1 $\beta$ . **J. Neurosci.**, v. 18, n.6, p.2247–2253, 1998.

HAQUE, M. et al. Localisation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in mineralocorticoid receptor expressing magnocellularneurosecretoryneurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. **J. Neuroendocrinol.**, v. 27, p. 835–849, 2015.

HIYAMA, T.Y. et al. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na(x) sodium channels for the control of salt intake behavior. **J. Neurosci.**, v. 24, n.42, p.9276-9281, 2004.

HIYAMA, T.Y. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na(x) sodium channels for the control of salt intake behavior. **J. Neurosci.**, v. 24, n.42, p.9276-9281, 2004.

HORN, T. Reduced febrile responses to pyrogens after lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. **Am. J. Physiol.**, v. 267, n.1, p.323- 328, 1994.

HOUPT, T.A. et al. c-fos-like immunoreactivity in the subfornical organ and nucleus of the solitary tract following salt intake by sodium-depleted rats. **Physiol. Behav.**, v. 63, n.4, p. 505-605, 1998.

HOYER, D. et al. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 71, p. 533-554, 2002.

HUANG, C.M. et al., Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 30, n.4, p.225-228, 2001.

HUANG, Y. et al. Neuron-specific effects of interleukin-1 $\beta$  are mediated by a novel isoform of the il-1 receptor accessory protein. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 49, p. 18048 –18059, 2011.

HURLEY, S.W.; JOHNSON, A.K. Dissociation of thirst and sodium appetite in the furo/cap model of extracellular dehydration and a role for N-methyl-D-aspartate receptors in the sensitization of sodium appetite. **Behav. Neurosci.**, v.127, n.6, p.890–898, 2013.

HYDE T.M.; MISELIS, R.R. Area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract in water and sodium balance. **Am. J. Physiol.**, v. 247, p.173-182, 1984.

IGWE, O. J. et al. Interleukin 1-induced cyclooxygenase and nitric oxide synthase gene expression in the rat dorsal root ganglia is modulated by antioxidants. **Neuroscience**, v. 105, n. 4, p. 971–985, 2001.

IRIKURA, V. M. et al. The epistatic interrelationships of IL-1, IL-1 receptor antagonist, and the type I IL-1 receptor. **J. Immunol.**, v. 169, n.1, p. 393-401, 2002.

JACOBS B. L.; AZMITIA E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **PhysiolRev.v.** ;2, p.165–229, 1992.

JOHNSON, A. K. The sensory Psychobiology of Thirst and salt Appetite. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 39, p. 1388-1400, 2007.

JOHNSON, A.K. et al. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. **Clin.Exp.Pharmacol. Physiol.**, v. 23, n. 2, p. 183-191, 1996.

JOHNSON, A.K. et al. The extended amygdala and salt appetite. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 877, p. 258-280, 1999.

JOHNSON, A.K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 39, n. 8, p. 1388-1400, 2007.

JOHNSON, A.K.; GROSS, P.M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **The FASEB J.**, v.7, p. 678-686, 1993.

JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: Visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front. in Neuroendocrinol.**, v. 18, p. 292-353, 1997.

KAMIKAWA, H. et al. IL-1 $\beta$  increases norepinephrine level in rat frontal cortex: involvement of prostanoids, NO, and glutamate. **Am. J. Physiol.Regul.Integr. Comp. Physiol.**, v. 275, p.803-810, 1998.

KANNAN, H. Effects of systemic interleukin-1 $\beta$  administration on daily drinking and renal excretory function in conscious rats. **Physiol. Behav.**, v. 61, p. 707–715, 1997.

KARÁDI, Z. et al. Homeostatic alterations after intrapallidal microinjection of interleukin-1 $\beta$  in the rat. **Appetite**, v. 44, p. 171–180, 2005.

KELLEY, K.W. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior and Immun.**, v. 17, p.112-118, 2003.

KENT, S. et al. Reduction in Food and Water Intake Induced by Microinjection of Interleukin-1/3 in the Ventromedial Hypothalamus of the Rat. **Physiol.Behav.**, v. 56, n. 5, p. 1031-1036, 1994.

KLUGER, M.J. et al. The use of knockout mice to understand the role of cytokines in fever. **Clin.Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 25, n.2, p. 141-144.

KONSMAN, J.P. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Trends in Neurosc.**, v. 25, p. 154-159, 2002.

KONSMAN, J.P. Diffusion and action of intracerebroventricularly injected interleukin-1 in the CNS. **Neuroscience**, v. 101, n.4, p. 957–967, 2000.

KRAUSE, E.G. Rictor and sodium appetite: From adrenalectomy to molecular biology. **Appetite**, v. 49, p. 353-367, 2007.

KRAUSE, E.G. et al. Post-ingestive signals and satiation of water and sodium intake of male rats. **Physiol.Behav.**, v. 99, n.5, p. 657-662, 2010.

KREIMEIER, U. Pathophysiology of fluid imbalance. **Crit. Care**. v. 4, v. 2, p. 3-7, 2000.

KUROSAWA, M. et al. Interleukin-1 increases activity of the gastric vagal afferent nerve partly via stimulation of type A CCK receptor in anesthetized rats. **J. Auton.Nerv. System**, v. 62, p. 72–78, 1997.

KUROSAWA, M. et al. Interleukin-1 increases activity of the gastric vagal afferent nerve partly via stimulation of type A CCK receptor in anesthetized rats. **J. Auton.Nerv. Syst.**, v. 62, p.72–78, 1997.

KWAK, A. et al. Intracellular interleukin (IL)-1 family cytokine processing enzyme. **Arch. Pharm. Res.**, v. 39, p. 1556- 1565, 2016.

LANE, J.M., et al. Increased sodium appetite stimulates c-fos expression in the organumvasculosum of the lamina terminalis. **Neuroscience**, v. 78, n. 4, p.1167-1176, 1997.

LARSEN, C.M., et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. **New Engl. J. Med.**, v. 356, n. 15, p. 1517-1526, 2007.

LEAL, M.C. et al. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ : reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? **Front. Cell Neurosci.**, v. 7, n.53, p.1-10.

LEDEBOER, A. et al. Site-specific modulation of LPS-induced fever and interleukin-1 $\beta$  expression in rats by interleukin-10. **Am. J. Physiol.Regul.Integr. Comp. Physiol.**, v. 282, p.1762-1772, 2002.

LEE, H.Y. et al. 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 Res. Bull.**, v. 46, n.6, p. 495-503, 1998.

LENARD, N. R.; BERTHOUD, H.R. Central and Peripheral Regulation of Food Intake and Physical Activity: Pathways and Genes. **Obesity**,v.16, n. 3, p.11-22, 2008.

LEON, L.R. et al. An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. **Am. J. Physiol.**,v. 276, n.1, p. 81-89, 1999.

LEWIS, A.M et al. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. **J. Transl. Med.**, v. 4, n. 48, p. 1-12, 2006.

LEWIS, A.M. et al. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. **J Transl Med.** v.48, n.4, p. 1-12, 2006.

LICINIO, J.; WONG, M.L. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. **J. Clin. Invest.**, v. 28, p.23-5, 1997.

LIMA, H.R.C. et al. Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by sodium depletion or beta-adrenergic stimulation. **Ann. Braz. Acad. Sci.**, v. 76, n. 1, p. 85-92, 2004.

LIMA, H.R.C. et al. Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by sodium depletion or beta-adrenergic stimulation. **Ann. Braz. Acad. Sci.**, v. 76, n. 1, p. 85-92, 2004.

LUZ, C.P. et al. 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.**, v. 1099, p. 121-132, 2006.

LUZ, C.P. et al. 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 Res.**, v. 1139, p. 178-194, 2007

LUZ, P.A. et al. Blockade of central kappa-opioid receptors inhibits the anti-dipsogenic effect of interleukin-1 $\beta$ . **Neuropeptides**, v. 43, p. 93-103, 2009.

LUZ, P.A. et al. Inhibition of water intake by the central administration of IL-1 $\beta$  in rats: Role of the central opioid system. **Neuropeptides**, v. 40, p. 85-94, 2006.

MANESS, L.M. et al. Relative contributions of a CVO and the microvascular bed to delivery of blood-borne IL-1 $\alpha$  to the brain. **A J Physiol- Endocrinol.Metabol.**, v.275, n. 2, p. 207-212, 1998.

MARAIS, M. Brain IL-6- and PG-dependent actions of IL-1 $\beta$  and lipopolysaccharide in avian fever. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 301, n. 3, p. 791-800, 2011.

MATSUDA, T. et al. Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. **Nat. Neurosci.**, v. 20, n.2, p.230-241, 2017.

MAZER, C. et al. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. **Brain Res.**, v.760, n. 1, p.68-73, 1997.

MCALLEN, R. Preoptic thermoregulatory mechanisms in detail. **Am. J. Physiol.Regul.Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, p.272-273, 2004.

MCCARTHY, D. et al. Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 42, p. 1179-1182, 1985.

MCKINLEY, M.J. et al. Brain angiotensin and body fluid homeostasis. **Jap. J. Physiol.**, v. 51, p. 281-289, 2001.

MCKINLEY, M.J. et al. Intravenous angiotensin II induces Fos-immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. **Brain Res.**, v. 594, n.2, p. 295-300, 1992.

MCKINLEY, M.J. et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological role. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 35, n. 6, p.901-918, 2003.

MCKINLEY, M.J. et al. The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. **J.Clin.Neurosci.**, v. 6, n.4,p. 289-301, 1999.

MCKINLEY, M.J. et al. The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. **Acta Physiol.**, v. 214, p. 8–32, 2015.

MCKINLEY, M.J. et al. Water intake and the neural correlates of the consciousness of thirst. **Semin.Nephrol.**, v. 26, n. 3, p. 249-257, 2006.

MCKINLEY, M.J.; JOHNSON, A.K. The psychological regulation of thirst and fluid intake. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 1-6, 2004.

MENANI, J.V. et al. Lateral parabraquial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 270, n. 1, p. R162-168, 1996.

MENANI, J.V. et al. Lateral parabraquial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 2, p. R555-560, 1998.

MENANI, J.V. et al. Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 306, p. R201-210, 2014.

MENANI, J.V. et al. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. **Am. Physiol. Soc.**, v. 282, n. 3, p. 837-841, 2002.

MOHAN, S.; CAMPBELL, N.R.C. Salt and high blood pressure. **Clin. Sci.**, v.117, n.1, p.1-11, 2009.

MORRIS, M. et al. Salt craving: The psychobiology of pathogenic sodium intake. **Physiol.Behav.**, v.94, n. 5, p. 709–721, 2008..

MORRIS, M.J. et al. Salt craving: the psychobiology of pathogenic sodium intake. **Physiol.Behav.**, v. 94, p. 709-721, 2008.

MORRIS, M.J. et al. Salt craving: The psychobiology of pathogenic sodium intake. **Physiol.Behav.**, v. 94, p. 709-721, 2008.

NA, E.S et al. The neural substrates of enhanced salt appetite after repeated sodium depletions. **Brain Res.**, v.1171, p.104-110, 2007.

NEILL, J.C.; COOPER, S.J. Selective reduction by serotonergic agents of hypertonic saline consumption in rats: evidence for possible 5-HT<sub>1C</sub> receptor mediation. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 196-201, 1989.

NETEA, M. G. et al. IL -1 $\beta$  Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. **PLoSPathog.**, v. 6, n. 2, p. 1-9, 2010.

NETEA, M. G. et al. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. **Annu. Rev. Immunol.**, v.33, p. 49–77, 2015.

NETEA, M.G. et al. Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 33, p. 49-77, 2015.

NODA, M. Hydromineral neuroendocrinology: mechanism of sensing sodium levels in the mammalian brain. **Exp. Physiol.**, v. 92, n.3, p.513-522, 2007.

NODA, M. The Subfornical Organ, a Specialized Sodium Channel, and the Sensing of Sodium Levels in the Brain. **Neuroscientist**, v. 12, p. 80 – 91, 2006.

NORGREN, R. The gustatory system in mammals. **Am. J. Otolaryngol.**, v. 4, n. 4, p. 234-247, 1983.

OLDFIELD, B.J. et al. The neurochemical characterisation of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat. **Neuroscience**, v. 110, n.3, p. 515-526, 2002.

OLIVARES, E.L. et al. Effect of the electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 12, p. 1709-1716, 2003.

OLIVEIRA, C.M.B. et al. Citocinas e dor. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 61, n.2, p. 255-265, 2011.

OLIVEIRA, L.B. et al. Muscimol into the lateral parabrachial nucleus induces sympathetic-dependent pressor responses. **Faseb J.**, v. 20, p.772, 2006.

OSAKA, T. et al. H. Intraperitoneal administration of recombinant human interleukin-1 $\beta$  inhibits osmotic thirst in the rat. **Physiol. Behav.**, v. 51, p. 1267–1270, 1992.

OSBORN, O. et al. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet induced obesity. **Cytokine**, v. 44, n. 1, p. 141–148, 2008.

PALMER, G. et al. Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes. **Arthritis Res.**, v. 4, n.3, p. 226-231, 2002.

PAN, W. et al. Cytokine Signaling Modulates Blood-Brain Barrier Function. **Curr. Pharm. Des.**, v.17, n.33, p.3729–3740, 2011.

PARNET, P., et al. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior . **J. Neuroimmun.**, v. 125, p.5– 14, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates** (compact 6t). Elsevier, San Diego, CA, USA, 2009.

PINEDA, E.A et al. Interleukin-1beta Causes Fluoxetine Resistance in an Animal Model of Epilepsy-Associated Depression. **Neurotherapeutics**,v.9, p. 477-485, 2012.

PLATA-SALAMAN, C.R.; FFRENCH-MULLEN, J.M.H. Intracerebroventricular administration of a specific IL-1 receptor antagonist blocks food and water intake suppression induced by interleukin-1b. **Physiol. Behav.**, v. 51, p. 1277–1279, 1992.

QUAN, N.K. et al. Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. **J. Neuroimmunol.**,v. 49, p.125-134, 1994.

RAEBURN, C.D. et al. Cytokines for surgeons. **Am. J. Surg.**,v. 183, p. 268-273, 2002.

RAMADORI, G.; ARMBRUST, T. Cytokines in the liver. **Eur. J. Gastroenterol.Hepatol.**, v. 13, n. 7, p.777-784, 2001.

RAMAMOORTHY, S. et al. Regulation of the human serotonin transporter by interleukin-1 beta. **Biochem.Biophys. Res. Commun.**, v. 216, n.2, p. 560-567, 1995.

REIS, L.C. et al. Participation on the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. **Proc.Natl.Acad. Sci. USA.**, v. 91, n. 25, p. 12022-12026, 1994.

REIS, L.C. Role of the serotonergic system in the sodium appetite control. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 79, n. 2, p. 261-283, 2007.

RICHTER, C.P. Increased salt appetite in adrenalectomized rats. **Am. J. Physiol.**, v. 115, p.155-161, 1936.

RICHTER, C.P. Salt taste thresholds for normal and adrenalectomized rats. **Endocrinology**, v.24, p. 367–371, 1939.

RICOTE, M. et al. Interleukin-1 (IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and Its Receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in Prostate Carcinoma. **Cancer**, v. 100, n.7, p. 1387-1396, 2004.

- ROCHA, M. J. et al. Sinoaortic denervation alters the molecular and endocrine responses to salt loading. **Neuroendocrinology**, v. 57, n.4, p.729-737, 1993.
- ROTHWELL, N.J., HOPKINS, S.J. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. **Trends Neurosci.** v. 18, p. 130-136, 1995.
- ROUAH-ROSILIO, M. et al. Serotonergic modulation of sodium appetite in the rat. **Physiol.Behav.**, v. 55, n. 5, p. 811-816, 1994.
- ROWLAND, N.E. et al. Expression of Fos in rat brain in relation to sodium appetite: furosemide and cerebroventricular renin. **Brain Res.**, v. 728, n.1, p. 90-96, 1996.
- SALISBURY, J.J. et al. Postingestional modulation of drinking induced in rats by angiotensin II: intragastric infusion and sham drinking studies. **Physiol.Behav.**, v. 40, n.4, p.539-543, 1987.
- SANTARLASCI, V. et al. IL-1 and T Helper Immune Responses. **Front Immunol.** v.4, p.182-189, 2013.
- SAPERSTEIN, A. et al. Interleukin 1 beta mediates stress-induced immunosuppression via corticotropin-releasing factor. **Endocrinology**, v. 130, n.1, p.152-158, 1992.
- SATO, M.A., et al. Idazoxan and the effect of intracerebroventricular oxytocin or vasopressin on sodium intake of sodium-depleted rats. **Regul.Pept.**, v. 69, n. 3, p.137-142, 1997.
- SCHETT, G. et al. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. **Nature Rev. Rheumatol.**, v. 12, p. 14-24, 2016.
- SCHULZ, M.; ENGELHARDT, B. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cerebrospinal Fluid Res.**, v. 2, n.8, p.1-14, 2005.
- SGROI, A. et al. Interleukin-1 Receptor Antagonist Modulates the Early Phase of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice. **PLoS ONE**, v. 6, n.9, p. 1-13.
- SHAFTEL, S.S. et al. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. **J. Neuroinflam.**, v.5, n.7, p.1-12, 2008.
- SHINTANI, F. et al. Interleukin-1 $\beta$  augments release of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the rat anterior hypothalamus. **J. Neurosci.**, v. 7, n. 8, p. 3574-3581, 1993.
- SMITH, P.M.; FERGUSON, A.V. Circulating signals as critical regulators of autonomic state—central roles for the subfornical organ. **Am. J. Physiol.**, v. 299, n. 2, p. 405-415, 2010.
- SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain. In: BEAULIEU, P. et al. **Pharmacology of Pain.** 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010. P. 279-302.
- SONTI, G. et al. Interleukin-1 (IL-1) receptor type I mediates anorexia but not adiposia induced by centrally administered IL-1beta. **Physiol.Behav.**, v. 62, n.5, p.1179-1783, 1997.



- SPECTOR, A.C. et al. Rewiring the gustatory system: specificity between nerve and taste bud field is critical for normal salt discrimination. **Brain Res.**, v. 1310, p. 46-57, 2010.
- STACHENFELD, N.S. Acute effects of sodium ingestion on thirst and cardiovascular function. **Curr. Sports Med. Rep.**, v.7, v. 4, 7-13, 2008.
- STEINMAN, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. **Nature Immunol.**, v. 5, p. 575 – 581, 2004.
- STRICKER, E.M.; HOFFMANN, M.L. Control of thirst and salt appetite in rats: Early inhibition of water and NaCl ingestion. **Appetite**, v 46, p. 234-237, 2006.
- STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. **Regul. Pept.**, v. 66, n.1-2, p. 83-5, 1996.
- STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G., et al. Inhibition of salt appetite in rats by central oxytocin. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.287, n. 2, p. 487-585, 2004.
- SZELÉNYI, J. Cytokines and the central nervous system. **Brain Res. Bull.**, v. 54, n. 4, p.329-338, 2001.
- TAKÁCS, G. et al. Homeostatic alterations after IL-1 $\beta$  microinjection into the nucleus accumbens of the rat. **Appetite**, v. 54, p. 354-362, 2010.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin. Immunol.**, v. 16, p. 3–9, 2004.
- TANAKA, J. et al. Involvement of serotonergic systems in the lateral parabrachial nucleus in sodium and water intake: a microdialysis study in the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 357, n. 1, p. 41-44, 2004.
- TANAKA, J. et al. Responses of raphe nucleus projecting subfornical organ neurons to angiotensin II in rats. **Brain Res. Bull.**, v. 45, n. 3, p. 315-318, 1998.
- THUNHORST, R.L. et al. Angiotensin converting enzyme in subfornical organ mediates captopril-induced drinking. **Behav. Neurosci.**, v. 103, p. 1302-1310, 1989.
- THUNHORST, R.L. et al. Effects of sinoaortic baroreceptor denervation on depletion-induced salt appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 267, n.4, p. 1043-1049, 1994.
- THUNHORST, R.L. et al. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 6, p. 1807-1814, 1998.
- TURRIN, N.P., et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. **Brain Res. Bull.**, v. 54, n.4, p.443-453, 2001.

VAN DER MEER, M.J.M. et al. Chronic stimulation of the hypothalamus\_pituitary\_adrenal axis in rats by interleukin -1  $\beta$ : central and peripheral mechanisms. **Cytokine**, v. 12, n.1, p. 910-919, 1996.

VAN DER MEER, M.J.M. et al. Chronic stimulation of the hypothalamus\_pituitary\_adrenal axis in rats by interleukin -1  $\beta$ : central and peripheral mechanisms. **Cytokine**, v. 12, n.1, p. 910-919, 1996.

VAN DONKELAAR, E.L et al. Mechanism of acute tryptophan depletion: is it only serotonin? **Mol Psychiatry**. v. 16, p. 695-713, 2011.

VAN TESSEL, B.W. et al. Targeting Interleukin-1 in Heart Disease. **Circulation**, v. 128, p.1910-1923, 2013.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas; revisão. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, v.24, n. 4, p. 146-154, 2001.

VERBALIS, JG. Disorders of body water homeostasis. **Best Practice & Res. Clin. Endocrinol.& Metab.**, v.17, n. 4, p. 471–503. 2003.

VITKOVIC, L.et al. “Inflammatory” cytokines: neuromodulators in normal brain? **J. Neuroche**, v.74, p. 457-471, 2000.

VOORHIES, A.C.; BERNSTEIN, I.L. Induction and expression of salt appetite: Effects on Fos expression in nucleus accumbens. **Behav Brain Res.**, v. 172, p. 90–96, 2006.

WATANABE, E. et al. Nav2/NaG Channel Is involved in control of salt- Intake Behavior in CNS. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 7743-7751, 2000.

WATANABE, E. et al. Sodium-level-sensitive sodium channel Nax is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. **Am. J. Physiol.Regul.Integr. Comp. Physiol.**, v. 290, p.568-576, 2006.

WATANABE, U. A comparison of voluntary salt-intake behavior in Nax-gene deficient and wild-type mice with reference to peripheral taste inputs. **Brain Res.**, v. 967, n.1-2, p. 247-56, 2003.

WATKINS, L.R. et al. Dynamic regulationof the proinflammatory cytokine, interleukin-1 $\beta$ : molecular biology for nonmolecularbiologists. **Life Sci.**, v. 65, p. 449–481, 1999.

WATSON, W. E.The effect of removing area postrema on the sodium and potassium balances and consumptions in the rat. **Brain Res.**, v.359, p. 224-232, 1985.

WEISINGER, R.S. et al. Subfornical organ lesion decreases sodium appetite in the sodium-depleted rat. **Brain Res.**, v. 526, n.1, p.23-30, 1990.

WHITE, F.A. et al. Chemokines: integrators of pain and inflammation. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, n.10, p. 834–844, 2005.

ZARDETTO-SMITH, A.M. et al. Role of the central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the striaterminalis in experimentally-induced salt appetite. **Brain Res.**, v. 645, p. 123-134, 1994.

ZETTERSTROM, M.M. et al. Delineation of the Proinflammatory Cytokine Cascade in Fever Induction. **Ann. New York Acad. Sci. Mol. Mech. Fever**, v. 856, p. 48-52, 1998.

ZHANG, J.M., AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int. Anesthesiol. Clin.**, v. 45, n. 2., p. 27-37, 2007. 2007.