

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (PIPGFC) UFSCar-UNESP

ROBERTO LOPES DE ALMEIDA

Efeito de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* no apetite ao sódio

ARARAQUARA

2009

Efeito de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* no apetite ao sódio

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (PIPGFC) UFSCar-UNESP

ROBERTO LOPES DE ALMEIDA

Efeito de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* no apetite ao sódio

**Tese apresentada ao Programa
Interinstitucional de Pós-
Graduação em Ciências
Fisiológicas da Universidade
Federal de São
Carlos/Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências, área de concentração:
Fisiologia.
Orientador: Laurival Antonio De
Luca Jr**

ARARAQUARA

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A447eL

Almeida, Roberto Lopes de.

Efeito de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* no apetite ao sódio / Roberto Lopes de Almeida. -- São Carlos : UFSCar, 2015.

115 f.

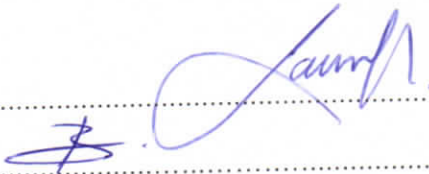

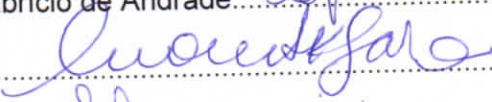
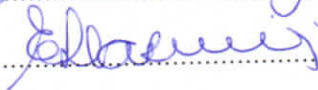
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fisiologia. 2. Equilíbrio hidroeletrólítico. 3. Sede. 4. Pressão arterial. I. Título.

CDD: 612 (20ª)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Tese de Roberto Lopes de Almeida

Prof. Dr. Laurival Antonio De Luca Jr.....
Profª. Drª. Lisandra Brandino de Oliveira.....
Profª. Drª. Carina Aparecida Fabricio de Andrade.....
Profª. Drª. Monica Akemi Sato.....
Profª. Drª. Evelin Capellari Cárnio.....

**AOS MEUS PAIS,
JOSÉ LOPES E SILVIA**

**IRMÃOS,
LUCIANA E ANDRÉ**

**E À MINHA METADE
CRISTIANA**

Obrigado a todos pelo amor e apoio constantes.

*"O único homem que está isento de erros
é o que não arrisca tentar"*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Laurival Antonio De Luca Jr pela orientação, apoio e dedicação a este trabalho.

Aos funcionários Ana, Reginaldo, Silvia, Silvana e Silas e também a todos os professores, pós-graduandos, estagiários e amigos do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelo apoio, atenção e amizade.

Aos meus pais, irmãos, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos meus amigos (as) e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Cristiana Akemi Ogihara por caminhar ao meu lado sempre e querer disso seu futuro.

RESUMO

Lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina derivada da parede da bactéria gram-negativa, desencadeia um conjunto de respostas sistêmicas e comportamentais, que se agrupam sob a denominação de comportamento de doença (sickness behavior). Grande número de trabalhos mostra a inibição de comportamento ingestivo no animal que tem ativação do sistema imune induzido por injeção sistêmica de LPS. O objetivo deste trabalho foi demonstrar que o LPS inibe o apetite ao sódio em doses menores daquelas que causam os efeitos letais desta endotoxina e que a ação inibitória do LPS sobre o apetite ao sódio envolve mecanismos adrenérgicos α_2 . Foram produzidos três trabalhos onde mostramos os efeitos do LPS no apetite ao sódio, na pressão arterial e em diferentes tipos de sede. No primeiro trabalho mostramos que LPS inibiu o apetite ao sódio e apenas as doses mais altas produziram inibição na sede, além de reduzir volume urinário e natriurese, sem alterar os parâmetros cardiovasculares em ratos tratados com o protocolo FURO/CAP. LPS aboliu sede intracelular e reduziu volume urinário e natriurese em ratos que receberam gavagem de NaCl 2M. A sede também foi reduzida pelo tratamento com LPS em ratos tratados com FURO apenas. Esses resultados sugerem que o LPS tem efeito preferencial sobre o apetite ao sódio e sobre a sede intracelular. No segundo trabalho mostramos que LPS reduz o apetite ao sódio e que essa inibição é abolida se há tratamento prévio com ioimbina ip, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 em ratos depletados de sódio. Esse mesmo antagonista quando associado com LPS produz hipotensão em ratos depletados de sódio. LPS diminuiu a taxa de esvaziamento gástrico em animais depletados de sódio e esse efeito não foi abolido pelo prévio tratamento com ioimbina. Devido ao fato desses efeitos sistêmicos do LPS não explicarem a inibição no apetite ao sódio podemos sugerir que o LPS exerce um efeito inibitório no apetite ao sódio provavelmente mediado por receptores adrenérgicos α_2 centrais. No terceiro trabalho confirmamos que o LPS inibe o apetite ao sódio e que vias centrais noradrenérgicas α_2 centrais medeiam essa inibição pois o RX-821002, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , injetado icv, também aboliu a inibição no apetite ao sódio induzida pelo LPS sistêmico em ratos depletados de sódio sem produzir alterações nos parâmetros cardiovasculares. Esse conjunto de resultados expostos por meio destes três trabalhos sugere que o LPS inibe o apetite ao sódio e essa inibição é mediada por receptores adrenérgicos α_2 de origem central.

Palavras-chave: Apetite ao sódio. Sede. Endotoxina. Receptores adrenérgicos. Pressão arterial. Sepse. Comportamento de doença.

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin derived from gram-negative bacteria wall, triggers a conjunct of systemic and behavioral responses grouped under the name of sickness behavior. Several works show the inhibition of ingestive behavior in animals with activated immune system by systemic LPS. The aim of this work was demonstrate that LPS inhibit sodium appetite in lower doses than those that cause lethal effects and that LPS inhibitory action on sodium appetite involves α_2 adrenergic mechanisms. Were produced three works where we show the LPS effects on sodium appetite, on arterial pressure and in different kinds of thirst. In the first work, we showed that LPS inhibited sodium appetite and only higher doses produced thirst inhibition, besides reduced urinary volume and natriuresis, without alterations on cardiovascular parameters in FURO/CAP-treated rats. LPS abolished intracellular thirst e reduced urinary volume and natriuresis in 2M NaCl gavage-treated animals. LPS also reduced thirst in FURO-treated animals. These results suggest that LPS has a preferential effect on sodium appetite and on thirst intracellular thirst. In the second work we showed that LPS reduce sodium appetite and that this inhibition is abolished by previous treatment with yohimbine ip, an α_2 adrenoceptor antagonist in sodium depleted rats. Yohimbine when combined with LPS produced hypotension in sodium depleted rats. LPS reduced gastric empty in sodium depleted rats and this effect wasn't abolished by previous treatment with yohimbine. The systemic effects do not explain the inhibition on sodium appetite and we can suggest that LPS exert an inhibitory effect on sodium appetite probably mediated by central α_2 adrenoceptors. In the third work we confirmed that LPS inhibit sodium appetite and that central α_2 adrenergic ways mediated this response because RX-821002, an α_2 adrenoceptor antagonist injected icv, abolished sodium appetite inhibition induced by systemic LPS in sodium depleted rats without produced alterations in cardiovascular parameters. All results exposed with these three works suggest that LPS inhibit sodium appetite and this inhibition is mediated by central α_2 adrenoceptors.

Key-words: Sodium appetite. Thirst. Endotoxin. Adrenoceptors. Arterial pressure. Sepsis. Sickness behavior.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BHE – barreira hemato-encefálica

CAP – captopril

FC – frequência cardíaca

FURO – furosemida

g – grama(s)

h – hora(s)

icv – intracerebroventricular

ip – intraperitoneal

kg – quilograma

LPS – lipopolissacarídeo

M – molar

mg – miligrama(s)

min – minutos

ml – mililitro(s)

mm – milímetro(s)

NaCl – cloreto de sódio

OCVs – órgãos circunventriculares

PAM – pressão arterial média

SAL – salina

sc – subcutâneo

VEI – veículo

YOH – ioimbina

RX – RX-821002

% – por cento

α – alfa

β – beta

± – mais ou menos

μg – micrograma(s)

μl – microlitro (s)

< – menor

> – maior

SUMÁRIO

Introdução	14
Manuscrito 1: Lipopolissacarídeo reduz ingestão de sódio e excreção de sódio em ratos desidratados	33
Resumo	33
Introdução	34
Métodos	37
Protocolos	40
Resultados	43
Discussão	57
Agradecimentos	62
Referências	63
Manuscrito 2: Inibição do apetite ao sódio por lipopolissacarídeo: envolvimento de receptores adrenérgicos α_2	66
Resumo	66
Introdução	67
Métodos	69
Protocolos	71
Resultados	74
Discussão	84
Agradecimentos	87
Referências	88
Manuscrito 3: Envolvimento de receptores adrenérgicos α_2 centrais na inibição do apetite ao sódio induzida por lipopolissacarídeo	93
Resumo	93
Introdução	94
Métodos	96

Protocolos	99
Resultados	102
Discussão	108
Agradecimentos	111
Referências	112

Introdução

Lipopolissacarídeo

Lipopolissacarídeos (LPS), constituintes exclusivos da parede celular de bactérias gram-negativas, são liberados na corrente circulatória após a morte ou lise destas bactérias. O LPS é o principal constituinte da bactéria gram-negativa que é reconhecido pelo sistema imune.

A membrana citoplasmática da bactéria gram-negativa tem duas camadas, uma interna constituída de proteína e fosfolípídios, e outra externa, constituída de um complexo de fosfolípide, proteína, glicopeptídeo e LPS. O LPS é quimicamente particular para cada linhagem de bactéria, sendo utilizado para a classificação sorológica das várias espécies deste tipo de microorganismo, e tem sido designado de endotoxina para diferenciá-lo de outras substâncias tóxicas sintetizadas e excretadas pela célula íntegra e denominadas de “exotoxinas” (Morrison e cols., 1978; Rietschel e cols., 1992). A extração seletiva do material endotóxico serviu de base para um significativo entendimento da biologia e química das bactérias (Morrison e cols., 1978).

O LPS ativa células específicas do hospedeiro, induzindo-as a secretar moléculas mediadoras de diversas respostas que aparecem no local de infecção ou, através do sangue, em tecidos mais distantes. Os macrófagos são as células defensivas mais ativadas, englobando e destruindo substâncias prejudiciais ao hospedeiro. Além disso, eles secretam moléculas de diferentes tipos que trabalham em conjunto, seqüencial ou independentemente, para estimular ou ampliar respostas imunes contra uma invasão. Por exemplo, quando estimulados pelo LPS, os macrófagos produzem interleucinas (IL, 1, 6 ou 8), derivadas de proteínas, prostaglandinas (PGs), derivadas de lipídeos, ou óxido nítrico, um mediador gasoso (Didier e cols., 2002). Assim, quando uma bactéria gram-negativa invade um tecido e libera quantidades moderadas de LPS, a formação de produtos de macrófagos pode ajudar erradicar a infecção imediata atuando na sinalização do sistema imune, gerando uma resposta localizada e controlada. Os efeitos típicos causados pelo LPS - febre branda, recrutamento de componentes imunes específicos e componentes imunes menos específicos - servem para o restabelecimento do hospedeiro.

As principais citocinas pró-inflamatórias ativadas são a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF). IL-1 e outras citocinas agem no cérebro por duas vias de comunicação: 1) Uma rota neural representada pelos neurônios

aferentes primários que inervam o local onde a infecção se instalou; e 2) uma via humoral que envolve a produção de IL-1 por células fagocíticas nos órgãos circunventriculares seguida de difusão dessa IL-1 para áreas encefálicas onde se ligarão a receptores específicos (Dantzer, e cols., 2000). A produção da citocina pró-inflamatória IL-1, induz a produção de mais IL-1 ou de outras citocinas que potencializam (IL-6 ou TNF α) ou antagonizam (IL-10) seu efeito (Su e cols., 2000).

Citocinas pró-inflamatórias produzidas em resposta ao LPS podem diretamente agir no encéfalo para produzir respostas comportamentais, pois são transportadas ativamente através da barreira hemato-encefálica (BHE) (Banks e Kastin, 1996) e também podem atravessá-la onde é mais “fraca”, por exemplo, na região dos órgãos circunventriculares. No entanto, muitos trabalhos sugerem que células não-neurais que estão na BHE são os mais importantes locais de ação das citocinas em resposta ao LPS. Resultados mostram que células perivasculares e células endoteliais da BHE possuem receptores para citocinas (VanDam e cols., 1996; Deckert-Schluter e cols., 1999). Essas células ativadas vão sinalizar neurônios envolvidos na modulação de comportamentos ingestivos (Langhans, 2007).

Apesar das citocinas produzidas na periferia quando da ativação imune induzida pelo LPS poderem atingir alvos distantes no hospedeiro, a maioria das citocinas produzidas no sítio de infecção agem localmente. Por exemplo, aferências neurais, como o nervo vago que inerva a região subdiafragmática, podem ser alvo de citocinas como a IL-1 (Goehler e cols., 1999; Ek e cols., 1998). Porém, o vago não parece ser crucial para todos os efeitos induzidos pelo LPS. Por exemplo, vagotomia subdiafragmática não altera a anorexia induzida por injeção intraperitoneal de LPS (Schwartz e cols., 1997; Porter e cols., 1998), sugerindo uma mediação direta no sistema nervoso central.

Além da intermediação pelas citocinas, o LPS também agir diretamente em células dos órgãos circunventriculares. Estudos mostram que administração de LPS, reconhecido agonista de receptores TLR4, produziu um aumento na concentração de cálcio intracelular em microculturas de neurônios da área postrema por ativar receptores TLR4 (Wuchert e cols., 2008). Esses resultados mostram a direta interação do LPS com estruturas especializadas no encéfalo e revelam uma relevante via de comunicação da endotoxina com o encéfalo.

O LPS e os mediadores liberados pelos macrófagos podem desencadear respostas comportamentais importantes para o combate à infecção, como anorexia e letargia, e sistêmicas, como febre e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais. O conjunto dessas respostas recebe o nome de comportamento de doença (“sickness behavior”) (Langans, 2000).

O LPS possui propriedades depressivas no comportamento ingestivo de animais. É sabido que LPS pode inibir sede (Holmes e Miller, 1963; Foca e cols., 1983; Osaka e cols., 1992; Cross-Mellor e cols., 2000; Nava e cols., 2000) e esse comportamento de inibição da ingestão de líquidos faz parte da estratégia do organismo para economizar energia visando a recuperação do estado infeccioso. Trabalhos ainda mostram uma interação específica de mediadores inflamatórios, como interleucinas, que podem agir de maneira seletiva sobre o comportamento de sede, pois resultados mostram que interleucina-1 inibe seletivamente a sede induzida por desidratação intracelular (Osaka e cols., 1992).

É conhecida também a resposta de anorexia produzida pelo LPS (Langhans, 2007) e sugere-se, por exemplo, que essa inibição é mediada pela leptina (Grunfeld et al. 1996; Faggioni et al. 1998; Finck et al. 1998) pois leptina produziu um aumento na concentração plasmática de citocinas (Dixit et al. 2004). Trabalhos que usaram a administração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6 e TNF α) mostraram o aparecimento de anorexia sugerindo que a ativação do sistema imune contribui para a resposta de diminuição do comportamento ingestivo.

LPS e equilíbrio hidroeletrólítico

Os efeitos do LPS sobre o equilíbrio hidroeletrólítico são bem conhecidos para a situação de septicemia. Além de inibir a sede, o LPS influencia o transporte epitelial de sódio (Ciancio e cols., 1992; Schmidt e cols., 2007), a secreção de hormônios neurohipofisários e a pressão arterial (Giusti-Paiva e cols., 2002), produzindo assim alterações amplas que influenciam o balanço hidroeletrólítico. Redução no aporte de sódio para a circulação, por redução na reabsorção renal ou na absorção intestinal, acompanhada de redução na pressão arterial e da sede, contribui em conjunto para um quadro de desidratação extracelular e para um colapso circulatório caracterizando o choque septicêmico. A ação negativa desses fatores pode ser piorada quando atuando em conjunto com a hipertermia (Blatteis, 2000).

Menos estudados são os efeitos do LPS no balanço hidroeletrólítico em situações de infecção moderada. Sabe-se, por exemplo, que citocinas podem estar presentes na circulação em resposta ao exercício físico intenso (Ng e cols., 2008), mas não está claro, por exemplo, se o LPS interfere com o balanço hidroeletrólítico reduzindo a excreção e a ingestão de sódio.

Sede e apetite ao sódio: importância para o equilíbrio hidroeletrólítico

Para a sobrevivência das células, a regulação precisa do volume dos líquidos corporais e da osmolaridade plasmática é fundamental. A água é responsável por cerca de 60

% do peso corporal, estando dois terços da água no compartimento intracelular e um terço no compartimento extracelular. O sódio é um importante constituinte do compartimento extracelular e o maior determinante da osmolaridade, assim como do volume do líquido extracelular. Portanto, a quantidade de sódio nos líquidos corporais deve ser mantida dentro de estreitos limites de variação para assegurar um funcionamento ideal de inúmeros processos fisiológicos. Para a manutenção dessas quantidades de água e de sódio o organismo lança mão de comportamentos específicos como uma seletiva aquisição (procura) e ingestão de água, quando há uma diminuição desta no organismo, que é tradicionalmente definida como sede (Johnson & Thunhorst, 1997; Stricker, 2004) e a ingestão de sódio em resposta a uma depleção de sódio, que é chamada de apetite ao sódio e contribui para repor as necessidades de sódio do organismo (Epstein, 1991; Fitzsimons, 1998; Johnson & Thunhorst, 1997; Stricker, 2004).

As sociedades ocidentais ingerem uma quantidade de sódio na dieta acima do necessário, e esse excesso pode estar associado a doenças, como por exemplo, a hipertensão (Chobanian e cols., 2003). Quando essa ingestão de sódio excede a necessidade diária do organismo, o excesso é excretado, e a regulação dos líquidos corporais é feita por mecanismos renais. Contudo, mecanismos que asseguram a ingestão continuada dessas substâncias são fundamentais para a regulação do equilíbrio hidroeletrolítico. Um aumento na osmolaridade plasmática cerca de 2% e hipovolemia em torno de 10% causam sede em humanos (Fitzsimons, 1985). Quando a concentração extracelular de sódio aumenta, há um aumento na pressão osmótica efetiva do compartimento extracelular, promovendo uma redução do volume de água das células, caracterizando assim a “desidratação intracelular”. A desidratação pode ser absoluta quando há perda de água dos compartimentos celular e extracelular, como acontece na privação de água, ou relativa se existir apenas uma perda de água celular, que se difunde para o líquido extracelular, como ocorre, por exemplo, na ingestão ou sobrecarga de solutos osmoticamente ativos. Em situações como hemorragia, diarreia, vômito, depleção de sódio, ocorre redução unicamente do volume do líquido extracelular, caracterizando assim a “desidratação extracelular”. É importante destacar que nessa situação há uma perda conjunta de água e de sódio, e por isso ela é geralmente acompanhada de comportamento apetitivo ao sódio. Embora os dois tipos de desidratação sejam experimentalmente e clinicamente separáveis, é comum a ocorrência simultânea de ambas, principalmente durante privação hídrica (De Luca Jr e cols., 2005). Importante ressaltar o aparecimento de dois tipos diferentes de sede em função da desidratação ocorrida. A sede extracelular, muitas vezes acompanhada de apetite ao sódio, que visa reposição do volume do líquido extracelular induzida por

diminuição do volume do líquido extracelular (hipovolemia) e aparecimento de hipotensão (Fitzsimons, 1972; 1985). E sede intracelular, que visa o restabelecimento da osmolaridade a níveis menores induzida por uma desidratação intracelular decorrente de efeitos hiperosmóticos (Blass e Epstein, 1971).

A privação hídrica é um processo natural que resulta nos dois tipos de desidratação, desencadeando não apenas sede, mas também ingestão de sódio em seres humanos e animais (De Luca Jr. et al., 2007). Preferência ao sódio também aparece no ser humano quando ocorre administração de diuréticos acompanhada de dieta hipossódica, hemodiálise e gestação (Beauchamp e cols., 1990; Leshem e cols., 1997; Duffy e cols., 1998). As situações que aumentam ingestão de sódio apresentam um fator comum que é a diminuição no volume plasmático (hipovolemia).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é um importante sistema hormonal ativado em situações de hipovolemia. A renina, uma enzima proteolítica, atua sobre o substrato plasmático, o angiotensinogênio (uma proteína globular sintetizada no fígado), produzindo um decapeptídeo, a angiotensina I (ANG I). A ANG I sob a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) localizada especialmente nos endotélios da circulação pulmonar produz um octapeptídeo ativo, identificado como angiotensina II (ANG II). Atualmente, sabe-se que a fonte de renina é o aparelho justaglomerular renal, e que as células da mácula densa também exercem importante função no controle da secreção da renina. Fatores como redução da pressão de perfusão arterial renal, redução da concentração do íon sódio para a mácula densa, aumento da atividade do nervo renal, ativação dos receptores do subtipo adrenérgicos β_1 , catecolaminas ou prostaglandinas circulantes, ativam a secreção de renina (Fitzsimons, 1998).

Estudos de Fitzsimons (1966; 1970a; 1970b; 1971) e Epstein (1970; 1974; 1975; 1976; 1977) demonstraram que a renina e seu peptídeo efector ANG II são efetivos como estímulos dipsogênicos. Receptores centrais para ações da ANG II já foram demonstrados em diversas áreas encefálicas como órgão subfornical, órgão vasculoso da lâmina terminal, núcleo paraventricular, núcleo pré-óptico mediano, área postrema e núcleo do trato solitário, (Lewis e cols., 1986; McKinley e cols., 1987; Allen e cols., 1988). Dos vários receptores de ANG II (existem pelo menos quatro) os mais importantes para seu efeito dipsogênico são os receptores AT_1 presentes em órgãos circunventriculares prosencefálicos, tais como SFO e OVLT, podendo haver também alguma participação de receptores AT_2 (Fitzsimons, 1998).

Além dos fatores humorais (osmolaridade, concentração de sódio, hormônios) agindo em circuitos encefálicos que facilitam a ingestão de água e de sódio, informações dos barorreceptores arteriais, receptores de volume e receptores de baixa pressão chegam ao tronco encefálico e também contribuem para controlar a ingestão de água e sódio (Johnson e cols., 1997).

Sistema adrenérgico e LPS

Estudos mostram que inervação noradrenérgica é proveniente de grupos celulares catecolaminérgicos A1, A2 e A6 localizados na região posterior do encéfalo (Saper e cols., 1983). Por sua vez, estes grupos celulares catecolaminérgicos recebem inervação recíproca da região ventral da lâmina terminal (por exemplo, núcleo pré-óptico mediano-MnPO) (Zardetto-Smith e cols., 1995). Muitos estudos funcionais mostram que grupos celulares noradrenérgicos das regiões posteriores do encéfalo são ativados por hipovolemia e hipotensão e que essas respostas ativam vias noradrenérgicas ascendentes que liberam noradrenalina na região ventral da lâmina terminal (Elam e cols., 1985; Moore e cols., 1983; Quintin e cols., 1987).

Uma série de trabalhos mostra interação entre o sistema noradrenérgico e o sistema imune. Trabalhos mostraram que há um aumento na liberação de noradrenalina e conseqüente aumento na concentração plasmática de noradrenalina em animais em sepse (Hahn, 1995). Outros artigos mostram que citocinas pró-inflamatórias como $TNF\alpha$, IL-1 e IL-6 ativam o sistema nervoso simpático agindo através de receptores adrenérgicos (Besedovsky e cols., 1986). Outros resultados mostram ainda que órgãos linfóides recebem predominantemente inervação simpática noradrenérgica (Madden e cols., 1995). Estudos utilizando histofluorescência feitos desde a década de 60 têm corroborado a presença de fibras nervosas noradrenérgicas em órgãos linfóides mostrando que a comunicação entre o encéfalo e o sistema imune depende de receptores noradrenérgicos (Dahlström e cols., 1965; Zetterstrom e cols., 1973; Bulloch e cols., 1984; Kendal e cols., 1988).

A ativação do sistema imune feita com LPS é capaz de ativar a liberação central de noradrenalina, que é um ligante endógeno para receptores adrenérgicos α_2 e essa liberação é diminuída por antagonismo de receptores adrenérgicos α_2 administrados durante forte endotoxemia (Dunn e cols., 2005; Fessler e cols., 1996; Linthorst e cols., 1998). No sistema nervoso central, a resposta de ativação de neurônios produzida por ativação do sistema imune induzida por injeção sistêmica de LPS incluem neurônios noradrenérgicos dos grupos A1 e A2. E projeções axonais de neurônios noradrenérgicos ativados produzem ativação em áreas prosencefálicas como, por exemplo, hipotálamo e áreas límbicas que por sua vez possuem um papel modulador na ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenais que é ativado com a ativação imune (Ericsson e cols., 1994; Gaykema e cols., 2007; Schiltz e Sawchenko, 2007).

Evidências apontam que o sistema imune age ativando eixo HPA para produzir suas respostas comportamentais e sistêmicas principalmente pela presença de fibras noradrenérgicas simpáticas inervando partes no sistema imune (Elenkov e cols., 2000).

A inibição de comportamento ingestivo também é vista em trabalhos que focaram a manipulação de vias noradrenérgicas e especificamente os comportamentos de sede e apetite ao sódio. Um mecanismo inibitório da ingestão de água e de sódio presente em áreas prosencefálicas envolve os receptores adrenérgicos α_2 .

Fregly e colaboradores (1984) mostraram que ativação de receptores adrenérgicos α_2 está acompanhada de sede pois a injeção intracerebroventricular de fenilefrina, um agonista de receptores adrenérgicos α_2 inibiu sede induzida por angiotensina II, enquanto que inibição destes receptores aumentam a sede pois o efeito antidipsogênico produzido pela fenilefrina foi bloqueado por prévia injeção subcutânea de ioimbina, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 .

Trabalhos do nosso laboratório mostram que agonistas de receptores adrenérgicos α_2 inibem a ingestão de água e de sódio induzidas por diferentes estímulos (Callera et al., 1993; De Paula et al., 1996; De Luca Jr e cols., 1997; Menani et al., 1999).

Sugawara e colaboradores (1999) mostraram que a injeção direta de noradrenalina em áreas prosencefálicas tipicamente reduz de forma dose-dependente tanto a ingestão de água como a de sódio, mas não a ingestão de alimento e que esse efeito é antagonizado pelo pré-tratamento com idazoxan, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos, confirmando a participação dos receptores adrenérgicos α_2 localizados em áreas prosencefálicas na modulação da ingestão de água e de sódio. Assim, os prévios estudos confirmaram a participação dos receptores adrenérgicos α_2 localizados em áreas prosencefálicas na inibição da ingestão de água e de sódio (Fregly e cols., 1984; De Paula e cols., 1996; De Luca Jr e cols., 1997; Yada e cols., 1997a e 1997b; Menani e cols., 1999; Sugawara e cols., 2001; de Oliveira e cols., 2003; Andrade e cols., 2003).

Trabalhos do nosso laboratório mostram também que o efeito inibitório provocado por injeção intracerebroventricular de moxonidina, um agonista de receptores adrenérgicos α_2 sobre a sede induzida por privação de água foi abolida por prévia injeção intracerebroventricular de idazoxan, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 (Menani e cols., 1999).

Outros tipos de antagonistas de receptores adrenérgicos α_2 utilizados, o RX-821002, SK&F 86466 e ioimbina, produziram resultados de abolição do efeito inibitório da injeção icv de moxonidina sobre o apetite ao sódio em animais depletados de sódio (de Oliveira e cols., 2003).

Somando essas informações com o que foi exposto sobre a ação de vias catecolaminérgicas quando da ativação do sistema imune por injeção sistêmica de LPS, é

razoável supor que a inibição de comportamentos ingestivos induzida por administração sistêmica de LPS possa ser mediada por vias noradrenérgicas encefálicas que utilizam receptores adrenérgicos α_2 .

Objetivo

Nesta tese procuramos demonstrar que: 1) o LPS inibe a ingestão de sódio em doses aquém daquelas que causam os efeitos letais desta toxina, 2) a ação inibitória do LPS sobre o apetite ao sódio envolve mecanismos adrenérgicos α_2 .

Essa demonstração está acompanhada de estudos conferindo os efeitos do LPS sobre o balanço de sódio, efeitos na pressão arterial e efeitos sobre diferentes tipos de sede (extra vs. intracelular) em animais não-anestesiados. Em um primeiro manuscrito, mostramos que o LPS tem um efeito preferencial de inibição no apetite ao sódio dependendo da dose administrada, porque foi incapaz de afetar a ingestão de água. E com relação a uma resposta preferencial, foi visto também que o LPS foi mais efetivo em inibir a sede intracelular quando comparada com a sede extracelular. O LPS também reduziu a natriurese induzida por diurético furosemida ou por hiperosmolaridade, efeito que provavelmente pode ser usado para economizar água e eletrólitos e compensar a inibição da ingestão hidromineral num estado de infecção. Essas respostas de inibição da sede e do apetite ao sódio não estavam associadas a alterações na termorregulação do animal tratados com LPS já que no momento do teste de ingestão a temperatura retal dos animais já havia retornado a valores basais após uma hipotermia transiente (não foi observado hipertermia em nenhuma situação). Devido ao método utilizado (FURO/CAP) para induzir ingestão de sódio e água, não foi possível separar o efeito antinatriurético do LPS sobre seu efeito na ingestão de sódio, não sendo possível assim descartar completamente que a antinatriurese tenha sido responsável pela inibição da ingestão desse íon.

No segundo manuscrito mostramos que o LPS é capaz de inibir o apetite ao sódio independentemente de alterações na excreção de sódio uma vez que ele foi aplicado em animais que já estavam depletados de sódio por injeção de furosemida e remoção de sódio ambiental por 24 horas. Nesta segunda parte foi mostrado também que a inibição do apetite ao sódio em animais depletados de sódio pode ser mediada por receptores adrenérgicos, especificamente receptores adrenérgicos α_2 , e possivelmente atuando em receptores no sistema nervoso central, pois a prévia injeção sistêmica de ioimbina, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 aboliu a inibição do apetite ao sódio produzida pelo LPS porém este mesmo antagonista injetado novamente na periferia não foi capaz de alterar a inibição no

esvaziamento gástrico de animais depletados e tratados com LPS sistêmico. Quando foi feita a combinação de LPS com ioimbina, os animais apresentaram hipotensão na primeira hora após a injeção de LPS, porém essa alteração nos parâmetros cardiovasculares não influenciou as respostas de abolição da inibição do apetite ao sódio visto que o teste do apetite ao sódio se iniciou duas horas depois quando os valores da pressão arterial já haviam retornado aos níveis basais. Assim, os resultados sugerem que o LPS não atua em mecanismos periféricos, mas sim centrais, para inibir o apetite ao sódio.

No terceiro manuscrito confirmamos a idéia de que a inibição do apetite ao sódio induzida pelo LPS sistêmico em ratos depletados de sódio depende de receptores adrenérgicos α_2 de origem central pois a injeção intracerebroventricular prévia de RX-821002, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , em uma dose sem efeitos cardiovasculares, aboliu a inibição do apetite ao sódio induzida pelo LPS sistêmico.

Referências bibliográficas:

Allen AM, McKinley MJ, Mendelsohn FAO. Comparative neuroanatomy of angiotensin receptor localization in the mammalian hypothalamus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15, 137-145, 1988.

Andrade CAF, Oliveira LB, Martinez G, Silva DCF, De Luca Jr LA, Menani JV. Involvement of forebrain imidazoline and α_2 -adrenergic receptors in the antidiuretic response to moxonidine. *Ann N Y Acad Sci* 1009, 262-264, 2003.

Banks WA & Kastin AJ. Passage of peptides across the blood-brain barrier: Pathophysiological perspectives. *Life Scienc* 59, 1923–1943, 1996.

Beauchamp GK, Bertino M, Burke D, Engelman K. Experimental sodium depletion and salt taste in normal human volunteers. *Am J Clin Nutr* 51, 881-889, 1990.

Besedovsky HO, del Rey A, Sorkin E and Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233:652–654, 1986.

Blass EM, Epstein AN. A lateral preoptic osmosensitive zone for thirst in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 76(3):378-94, 1971.

Blatteis CM. Thermoregulation in complex situations: combined heat exposure, infectious fever and water deprivation. *Int J Biometeorol* 44:31-43, 2000.

Bulloch K and Pomerantz W. Autonomic nervous system innervation of thymic- related lymphoid tissue in wildtype and nude mice. *J Comp Neurol* 228:57–68, 1984.

Callera JC, Camargo LAA, De Luca Jr LA, Menani JV, Renzi A, Saad WA. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral preoptic area reduce water intake in dehydrated rats. *Pharmacol Biochem Behav* 46, 39-43, 1993.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo Jr JL. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. *JAMA*; 289:2560-72, 2003.

Ciancio MJ, Vitiritti L, Dhar A, Chang EB. Endotoxin-induced alterations in rat colonic water and electrolyte transport. *Gastroenterol* 103:1437-1443, 1992.

Cross-Mellor SK, Kent WDT, Kavaliers M, Ossenkopp KP. Examining the effects of lipopolysaccharide and cholecystokinin on water ingestion: comparing intake and palatability. *Brain Research* 861 220–232, 2000.

Dahlström AB, Zetterström BEM. Noradrenaline stores in nerve terminals of the spleen: Changes during hemorrhagic shock. *Science* 147:1583– 1585, 1965.

Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM, Kelley KW. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosc Basic Clin* 85, 60–65, 2000.

Deckert-Schluter M, Bluethmann H, Kaefer N, Rang A & Schluter D. Interferon-gamma receptor-mediated but not tumor necrosis factor receptor type 1- or type 2-mediated signaling is crucial for the activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine *Toxoplasma* encephalitis. *Am J Pathol* 154, 1549–1561, 1999.

De Luca Jr LA, Camargo LA, Menani JV, Renzi A, Saad WA. On a possible dual role for central noradrenaline in the control of hydromineral fluid intake. *Braz J Med Biol Res* 27, 905-914, 1997.

De Luca Jr LA, Vivas L, Menani JV. Controle neuroendócrino da ingestão de água e sal. In Neuroendocrinologia Básica e Aplicada, eds. Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Elias LLK, & Castro M, pp. 116-131. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

De Luca LA Jr, Vendramini RC, Pereira DT, Colombari DA, David RB, de Paula PM, Menani JV. Water deprivation and the double- depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. *Braz J Med Biol Res* 40(5):707-12, 2007.

de Oliveira LB, De Luca Jr LA, & Menani JV. Moxonidine and central α_2 -adrenergic receptors in sodium intake. *Brain Res* 993, 177-182, 2003.

De Paula PM, Sato MA, Menani JV, & De Luca Jr LA. Effects of central α_2 -adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. *Neurosci Lett* 214, 158, 1996.

Didier H, Thierry R. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta* 323 (2002) 59–72, 2002.

Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard JW, Taub DD. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 114, 57–66, 2004.

Duffy VB, Bartoshuk LM, S-MR, Rodin J. Taste changes across pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 855, 805-809, 1998.

Dunn AJ, Swiergiel AH, de Beaupaire R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* 29:891-909, 2005.

Ek M, Kurosawa M, Lundeberg T, Ericsson A. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 β : role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci* 18, 9471–9479, 1998.

Elam M, Svensson TH, Thoren P. Differentiated cardiovascular afferent regulation of locus coeruleus neurons and sympathetic nerves. *Brain Res* 358: 77–84, 1985.

Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve - an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52:595-638, 2000.

Epstein AN, Fitzsimons JT, Rolls BJ. Drinking induced by injection of angiotensin into the rain of the rat. *J Physiol* 210(2):457-74, 1970.

Epstein AN, Simpson JB. The dipsogenic action of angiotensin. *Acta Physiol Lat Am* 24(5):25-8, 1974.

Epstein AN, Fourth JAF Stevenson Memorial Lecture. The physiology of thirst. *Can J Physiol Pharmacol* 54(5):639-49, 1976.

Epstein AN. Neurohormonal control of salt intake in the rat. *Brain Res Bull* 27, 315–320, 1991.

Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci* 14:897–913, 1994.

Faggioni R, Fantuzzi G, Fuller J, Dinarello CA, Feingold KR & Grunfeld C (1998) IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation. *Am J Physiol* 274, R204–R208, 1998.

Fessler HE, Otterbein L, Chung HS, Choi AM. Alpha-2 adrenoceptor blockade protects rats against lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1689-1693, 1996.

Finck BN, Kelley KW, Dantzer R, Johnson RW. In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor-alpha in the induction of leptin by lipopolysaccharide. *Endocrinol* 139, 2278–2283, 1998.

Fitzsimons JT. Hipovolaemic drinking and renin. *J Physiol* 186: 130-131, 1966.

Fitzsimons JT. Interactions of intracranially administered renin or angiotensin and other thirst stimuli in drinking. *J Physiol* 210: 152-153, 1970a.

Fitzsimons JT. The renin-angiotensin system in the control of drinking. In: *The Hypothalamus*. Edited by L. Martini, M. Motta, and F. Fraschini. New York: Academic 205-212, 1970b.

Fitzsimons JT. The effect of drinking of peptide precursors and of shorter chain peptide fragments of angiotensin II injected into rat's diencephalon. *J Physiol* 214: 295-303, 1971.

Fitzsimons JT. Thirst. *Physiol Rev* 52(2):468-561, 1972.

Fitzsimons JT. Physiology and pathology of thirst and sodium appetite. In *The kidney: physiology and pathophysiology*, eds. Seldin DW & Giebisch G, pp. 885-901, 1985.

Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 78, 583-686, 1998.

Foca A, Nicoletta P, Matera G, Mastroeni P, Caputi AP. Antidipsogenic effect of endotoxin in the rat. *Circ Shock* 11:341-50, 1983.

Fregly MJ, Rowland N, Greenleaf JE. A role for presynaptic α_2 -adrenoceptors in angiotensin II-induced drinking in rats. *Brain Res Bull* 12, 393-398, 1984.

Gaykema RPA, Chen CC, Goehler LE. Organization of immuneresponsive medullary projections to the bed nucleus of the stria terminalis, central amygdala, and paraventricular nucleus of the hypothalamus: evidence for parallel viscerosensory pathways in the rat brain. *Brain Res* 1130:130-145, 2007.

Giusti-Paiva A, De Castro M, Antunes-Rodrigues J, Carnio EC. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. *Crit Care Med* 30(6):1306-10, 2002.

Goehler LE, Gaykema RP, Nguyen KT, Lee JE, Tilders FJ, Maier SF, Watkins LR. Interleukin-1 β in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci* 19, 2799–2806, 1999.

Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollock A, Moser A, Friedman J & Feingold KR. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters – A role for leptin in the anorexia of infection. *J Clin Invest* 97, 2152–2157, 1996.

Hahn PY, Wang P, Tait SM, Ba ZF, Reich SS, Chaudry IH. Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. *Shock* 4:269–273, 1995.

Holmes JE, Miller NE. Effects of bacterial endotoxin on water intake, food intake, and body temperature in the albino rat. *J Exp Med* 118:649-658, 1963.

Hsiao S, Epstein AN, Camardo JS. The dipsogenic potency of peripheral angiotensin II. *Horm Behav* 8(2):129-40, 1977.

Johnson AK, Epstein AN. The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. *Brain Res* 28;86(3):399-418, 1975.

Johnson AK, Thunhorst RL. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* 18, 292-353, 1997.

Kendall MD, Al-Shawaf A and Zaidi SA. The cholinergic and adrenergic innervation of the rat thymus. *Adv Exp Med Biol* 237:255–261, 1998.

Langhans, W. Anorexia of Infection: Current Prospects. *Nutrition* 16:996 –1005, 2000.

Langhans W. Symposium on 'Eating, illness and the gut: is there disorder in the house?' Signals generating anorexia during acute illness. *Proc Nutr Soc* 66, 321–330, 2007.

Leshem M, Rudoy J. Hemodialysis increases the preference for salt in soup. *Physiol Behav* 61, 65-69, 1997.

Lewis SJ, Allen AM, Verberne AJM, Figdor R, Jarrot B, Mendelsohn FAO. Angiotensin II receptor binding in the rat nucleus solitarius is reduced after unilateral nodose ganglionectomy or vagotomy. *Eur J Pharmacol* 125, 305-307, 1986.

Linthorst AC, Reul JM. Brain neurotransmission during peripheral inflammation. *Ann N. Y. Acad Sci.* 840:139-152, 1998.

McKinley MJ, Allen AM, Clevers J, Paxinos G, Mendelsohn FAO. Angiotensin receptor binding in the human hypothalamus: autoradiographic localization. *Brain Res* 420, 375-379, 1987.

Madden KS, Sanders VM and Felten DL. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:417–448, 1995.

Menani JV, Sato MA, Haikel L, Vieira AA, Andrade CAF, Silva DCF, Renzi A, De Luca Jr LA. Central moxonidine on water and NaCl intake. *Brain Res Bull* 49, 273-279, 1999.

Moore SD, Guyenet PG. Effect of blood pressure and clonidine on the activity of A2 noradrenergic neurons. *Soc Neurosci Abstr* 9: 549, 1983.

Morrison DC, Ulevitch RJ. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am J Pathol* 93, 527-618, 1978.

Nava F, Carta, G. Repeated lipopolysaccharide administration produces tolerance to anorexia and fever but not to inhibition of thirst in rat. *Int J Immunopharmacol* 22:943-53, 2000.

Ng QY, Lee KW, Byrne C, Ho TF, Lim CL. Plasma endotoxin and immune responses during a 21-km road race under a warm and humid environment. *Ann Acad Med Singapore* 37:307-14, 2008.

Osaka T, Kannan H, Kawano S, Ueta Y, Yamashita H. Intraperitoneal administration of recombinant human interleukin-1 beta inhibits osmotic thirst in the rat. *Physiol Behav* 51:1267-1270, 1992.

Porter MH, Arnold M, Langhans W. TNF-alpha tolerance blocks LPS-induced hypophagia but LPS tolerance fails to prevent TNF-alpha-induced hypophagia. *Am J Physiol* 274, R741-R745, 1998.

Quintin L, Gillon JY, Ghignone M, Renaud B, Pujol JF. Baroreflex-linked variations of catecholamine metabolism in the caudal ventrolateral medulla: An in vivo electrochemical study. *Brain Res* 425: 319-336, 1987.

Rietschel ET, Brade H, Lindner B, Zähringer, U. Biochemistry of lipopolysaccharides. In: MORRISON, D. C.; RYAN, J. L. Bacterial endotoxic lipopolysaccharides: molecular biochemistry and cellular biology. Boca Raton: CRC Press, v. 1, cap. 1, p. 3-41, 1992.

Saper CB, Reis DJ, Joh T. Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat. *Neurosci Lett* 42: 285-291, 1983.

Schwartz GJ, Plata-Salaman CR, Langhans W. Subdiaphragmatic vagal deafferentation fails to block feeding suppressive effects of LPS and IL-1 beta in rats. *Am J Physiol* 273, R1193-R1198, 1997.

Schiltz JC, Sawchenko PE. Specificity and generality of the involvement of catecholaminergic afferents in hypothalamic responses to immune insults. *J Comp Neurol* 502:455-467, 2007.

Schmidt CS, Höcherl K, Schweda F, Kurtz A, Bucher M. Regulation of sodium transporters during severe inflammation. *J Am Soc Nephrol* 18:1072-83, 2007.

Stricker EM. Thirst. In E. M. Stricker & S. C. Woods (Eds.), *Handbook of behavioral neurobiology* (2nd ed., pp. 507–545). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004.

Su GL, Klein RD, Aminlari A, Zhang HY, Steintraesser L, Alarcon WH, Remick DG, Wang SC. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology* 31, 932–936, 2000.

Sugawara AM, Miguel TT, de Oliveira LB, Menani JV, De Luca Jr LA. Noradrenaline and mixed α_2 -adrenoceptor/imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. *Brain Res* 839, 227-234, 1999.

Sugawara AM, Miguel TT, Pereira DT, Menani JV, De Luca LA Jr. Effects of central imidazolinerigic and alpha2-adrenergic activation on water intake. *Braz J Med Biol Res* 34:1185-1190, 2001.

VanDam AM, DeVries HE, Kuiper J, Zijlstra FJ, DeBoer AG, Tilders FJH & Berkenbosch F. Interleukin-1 receptors on rat brain endothelial cells: A role in neuroimmune interaction? *FASEB Journal* 10, 351–356, 1996.

Wuchert F, Ott D, Murgott J, Rafalzik S, Hitzel N, Joachim oth J, Gerstberger R. Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist Lipopolysaccharide. *J Neuroimmun* 204 66–74, 2008.

Yada MM, De Paula PM, Menani JV, De Luca Jr LA. Central α_2 -adrenergic agonists e need-induced 3% NaCl e water intake. *Pharmacol Biochem Behav* 57, 137-143, 1997a.

Yada MM, De Paula PM, Menani JV, Renzi A, Camargo LA, Saad WA, De Luca Jr LA. Receptor-mediated effects of clonidine on need-induced 3% NaCl and water intake. *Brain Res Bull* 42, 205-209, 1997b.

Zardetto-Smith AM, Johnson AK. Chemical topography of efferent projections from the median preoptic nucleus to pontine monoaminergic cell groups in the rat. *Neurosci Lett* 199; 215–219, 1995.

Zetterstrom BE, Hokfelt T, Norberg KA and Olsson P. Possibilities of a direct adrenergic influence on blood elements in the dog spleen. *Acta Chir Scand* 139: 117–122, 1973.

Manuscrito 1:

Lipopolissacarídeo reduz ingestão de sódio e excreção de sódio em ratos desidratados

¹Almeida, RL; ¹Constancio, J; ¹Vendramini, RC; ²Fracasso, JF; ¹Menani, JV; ¹De Luca Jr., LA*.

¹Departamento de Fisiologia e Patologia, FOAr e ²Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, FCFAr, UNESP, Araraquara, SP.

*** Autor para correspondência:** lucajr@foar.unesp.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi descobrir se lipopolissacarídeo (LPS) administrado intraperitonealmente afeta ingestão de sódio e de água e excreção renal em ratos desidratados. LPS (0,3-5 mg/kg) inibiu ingestão de NaCl 0,3 M induzida por injeção subcutânea do diurético furosemida (FURO, 10 mg/kg) combinado com o inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril (CAP, 5 mg/kg). Apenas as doses mais altas de LPS (2,5 e 5 mg/kg) inibiram ingestão de água induzida por FURO/CAP. LPS (0,6 mg/kg) reduziu volume urinário e excreção de sódio, mas não produziu efeito na pressão arterial média ou frequência cardíaca de ratos tratados com FURO/CAP. LPS (0,3-5 mg/kg) aboliu a sede intracelular e reduziu em 50% a excreção de sódio de ratos que receberam gavagem de 2 ml de NaCl 2 M. LPS (0,3-5 mg/kg) também reduziu sede em ratos tratados apenas com FURO (10 mg/rato sc). Os resultados sugerem que LPS tem um preferencial, mas não exclusivo efeito inibitório na ingestão de sódio e na sede intracelular. A inibição da ingestão hidromineral e a antinatriurese causada pelo LPS em ratos desidratados contribui para os múltiplos efeitos da endotoxina no balanço de líquidos e eletrolítico.

Palavras chave: LPS, apetite ao sódio, sede, desidratação, rim.

Introdução

Lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina derivada da parede da bactéria gram-negativa, desencadeia não apenas uma redução geral na atividade do animal, ou comportamento de doença (sickness behavior), mas também tem ampla influência no balanço dos líquidos corporais, ligado a secreção neurohipofisária, transporte de sódio pelo intestino e excreção de sódio [Ciancio e cols., 1992; Carnio e cols., 2006; Schmidt e cols., 2007]. Sede reduzida, associada com balanço de sódio prejudicado e desidratação, mais concomitante hipotensão, pode levar a um colapso geral nos compartimentos de volume em resposta ao LPS [Blatteis, 2000; Zurovski & Barbiro, 2000; Richmond, 2001; Ng, 2008].

A antidipsogênese induzida por LPS em ratos privados de água é conhecido há muitos anos e é mediado por produção central de óxido nítrico, prostaglandinas e provavelmente, TNF- α [Calapai e cols., 1992; Foca e cols., 1985, Nava & Carta, 2000]. De qualquer forma, pode existir uma diferença entre essa resposta e como o LPS age no mecanismo básico da sede. Relembrando, primeiro, que sede em animais privados de água é originada de uma dupla desidratação, que inclui redução no volume de ambos os compartimentos celular e intracelular [Epstein, 1973]. Segundo, LPS induz produção de interleucinas que podem mediar seus efeitos comportamentais [Dunn e cols., 2005]. E terceiro, interleucinas podem ter um efeito preferencial sobre um tipo de sede: por exemplo, interleucina-1 β seletivamente inibe a sede induzida por desidratação intracelular [Osaka e cols., 1992]. Então é razoável perguntar se LPS tem uma similar inibição. Além disso, devido à desidratação extracelular também induzir ingestão de sódio, um estudo completo dos efeitos do LPS associado ao restabelecimento do balanço de fluídos deveria também levar em consideração esse comportamento.

LPS interfere com excreção renal de sódio, um efeito sistêmico que pode também interferir com a ingestão de fluídos. Por exemplo, septicemia induz falha renal e pequeno aumento da excreção de sódio associado com redução na atividade transportadora de sódio

tubular [Schmidt e cols., 2007]. De qualquer forma, para a melhora do nosso conhecimento, não se sabe se LPS altera a excreção de sódio associada com procedimentos para induzir desidratação seletiva e ingestão de fluídos.

Diuréticos e sobrecarga de sódio são usados em procedimentos para induzir respectivamente sede extra e intracelular. O diurético furosemida induz ingestão de água agudamente em resposta a desidratação extracelular quando o apetite ao sódio é ainda incipiente [De Luca Jr e cols., 1992; Thunhorst & Johnson, 1994; Rowland & Morian, 1999] e gavagem de NaCl hipertônico produz ingestão de água em resposta a desidratação intracelular [Kutscher, 1966; Pereira e cols., 2002].

Procedimentos para induzir desidratação extracelular podem produzir não apenas ingestão de água, mas também ingestão de sódio, que aparece após muitas horas ou requer um forte estímulo inicial. Rápida ingestão de NaCl e água pode ser produzida em um teste de dois bebedouros por tratamento dos ratos com injeção sistêmica de furosemida combinada a captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (FURO/CAP). Esses efeitos do FURO/CAP podem ser explicados assumindo que enquanto furosemida induz rápida e forte desidratação extracelular – um poderoso estímulo para secreção de renina que converte angiotensinogênio em angiotensina I – o captopril administrado em uma dose baixa previne a formação de angiotensina II circulante. A reduzida conversão de angiotensina II pode assim aumentar a disponibilidade de angiotensina I a áreas encefálicas onde o captopril não alcançou [Schiffing and Genest, 1982; Fitts & Masson; 1989; Thunhorst & Johnson, 1994; Thunhorst, 1999; Johnson, 2007]. Angiotensina I é então convertida em angiotensina II no encéfalo e assim novamente formado angiotensina II, acompanhada por moderada hipotensão, o que ativa os circuitos que estimulam ingestão de sódio e de água.

O objetivo do presente trabalho foi descobrir primeiro, se LPS inibe ingestão de sódio e de água induzida por FURO/CAP e, segundo, se exerce um efeito preferencial sobre a

desidratação extracelular versus a desidratação intracelular. Efeitos do LPS na excreção renal de sódio associada com cada tratamento que induz desidratação também foram investigados.

Métodos

Animais

Ratos Holtzman pesando entre 280-320 gramas foram usados. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável e tiveram acesso livre a ração com mais sódio que o requerido pelo animal (0.5 – 1.0%, Guabi Rat Chow, Paulínia, São Paulo, Brasil), água e solução de NaCl 0,3 M. Os ratos foram mantidos sob temperatura da sala de 23 ± 2 °C, umidade da sala de $55 \pm 10\%$ e sob ciclo claro/escuro de 12 horas com as luzes se acendendo às 7h30. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal (CEEA) e seguidas as recomendações do Colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA).

Drogas

Lipopolissacarídeo extraído de *E. coli*, sorotipo 026:B6 (Sigma), foi dissolvido em salina isotônica estéril nas doses de 0,15-5 mg/kg de peso corporal.

Furosemida (diurético) (Sigma) foi dissolvido em salina isotônica, ajustado ao pH = 9,0 com solução hidróxido de sódio 0,1 N e administrado na dose de 10 mg/kg de peso corporal (FURO/CAP) ou 10 mg/rato (protocolo de indução de sede).

Captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) (Sigma) foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado na dose de 5 mg/kg de peso corporal.

Tiopental sódico (CRISTÁLIA, Itapira, SP, Brazil) foi injetado ip na dose de 8 mg/100 g de peso corporal para o sacrifício dos animais ao término dos experimentos.

Medida de temperatura corporal

Temperatura retal foi medida com uso de termômetro digital imediatamente antes da injeção de LPS e em intervalos descritos nos experimentos com FURO/CAP.

Coleta de amostras de urina

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas no início do teste e a urina eliminada espontaneamente foi coletada a cada 60 minutos por duas horas. Concentrações de sódio e potássio urinários foram medidas através de eletrodo íon sensível (Nova 1, Nova Biomedical).

Parâmetros sanguíneos

Imediatamente após decapitação, amostras de sangue troncular foram coletadas em tubos contendo gel separador e o soro foi separado por centrifugação (2000 rpm por 10 minutos). Concentrações de sódio e de potássio do soro foram medidas por eletrodo íon sensível. Concentração de proteína total plasmática foi medida por refratometria (Atago).

Pressão arterial e frequência cardíaca

Em ratos anestesiados com quetamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada a xilazina (7 mg/kg de peso corporal), um tubo de polietileno (PE-10 conectado a PE-50) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral para o registro da pressão arterial. O cateter arterial foi conduzido subcutaneamente e exteriorizado pelo dorso do rato. No dia seguinte, pressão arterial pulsátil, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram simultaneamente registradas em ratos não anestesiados através da conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão Statham Gould (P23Db) acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier, CB Sciences, Dover, NH, EUA) que foi conectado a

um sistema de aquisição de dados (modelo Powerlab 16SP, ADInstruments, Castle Hill, Austrália).

Sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico (gavagem de NaCl)

Os animais foram removidos de suas gaiolas e gentilmente treinados para receber uma sobrecarga intragástrica por infusão de água destilada (1 ml) através de sonda uretral conectada a uma seringa. A sobrecarga de sódio (2 ml de NaCl 2 M) é efetiva em induzir forte hipernatremia, natriurese, reduzir atividade da renina plasmática e sede e foi baseado em trabalhos prévios [Pereira et al., 2002]. O treino com os animais começou após 2 dias de adaptação e aconteceu uma vez ao dia por 5 dias. No 6º dia, cada animal recebeu uma sobrecarga de salina hipertônica após terem sido removidos os líquidos e a ração da gaiola. Água foi oferecida uma hora após a gavagem para o teste.

Estatísticas

Análise de variância de duas vias para medidas repetidas (ANOVA) foram usadas para analisar os dados dos testes de ingestão e pressão arterial com tratamento e tempo como fatores. Comparações planejadas foram feitas com o teste de Student-Newman-Keuls. Teste T não pareado foi usado para analisar os dados de bioquímica sanguínea e excreção renal. Probabilidade menor que 0,05 foi requerida para significância. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Dados de ingestão cumulativa e não-cumulativa foram apresentados para melhor clareza, mas apenas os dados de ingestão não-cumulativa foram usados para a análise estatística, como recomendado por Fitts (2006).

Protocolos

Efeito do LPS na ingestão de NaCl 0,3 M e água induzidas pela combinação de injeção de furosemida e captopril (FURO/CAP)

Os animais (n = 49) foram gentilmente manipulados para a medida da temperatura retal uma vez ao dia, para habituação, nos dias que precederam o teste com FURO/CAP. No dia do teste, ração e líquidos foram removidos e os animais, randomizadamente, receberam uma injeção intraperitoneal de LPS (0,15, 0,3, 0,6, 1,2, 2,5 ou 5,0 mg/kg) ou salina. Uma hora depois, todos os animais receberam uma injeção subcutânea do diurético e natriurético furosemida, FURO (10 mg/kg), e uma baixa dose do inibidor da enzima conversora de angiotensina captopril, CAP (5 mg/kg). Água e NaCl 0,3 M foram oferecidos em buretas de vidro graduadas (divisões de 0,1 ml) e a ingestão foi registrada aos 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos. Temperatura retal foi medida imediatamente antes da injeção de LPS, imediatamente antes do oferecimento das buretas, e aos 120 e 300 minutos.

Efeito do LPS na hipotensão induzida por FURO/CAP

Um grupo de animais (n = 14) recebeu um cateter intra-arterial sob anestesia como descrito acima. Imediatamente após a recuperação da cirurgia foram colocados em caixas de polipropileno individuais com o fundo coberto com serragem, tiveram acesso irrestrito a ração e água por 24 horas. Após isso, os animais foram transferidos para a sala de registro cardiovascular. Após 30 minutos nesta sala, água e ração foram removidos e o cateter conectado ao transdutor de pressão enquanto o animal permanecia dentro de sua caixa. PAM e FC basais foram registradas por 10 minutos. Após a medida basal, metade do grupo recebeu LPS 0,6 mg/kg ip e a outra metade recebeu uma injeção de salina como controle. Os registros cardiovasculares continuaram sem interrupção por mais 60 minutos. Cada animal recebeu

então uma injeção de FURO/CAP e os parâmetros cardiovasculares foram registrados por mais 90 minutos.

Efeito do LPS na excreção urinária e bioquímica sanguínea em ratos tratados com FURO/CAP

Um grupo de animais (n = 15) foi transferido para gaiolas metabólicas individuais, onde não tinham nem ração nem líquidos disponíveis. Este grupo foi subdividido em dois grupos, um que recebeu LPS 0,6 mg/kg ip e outro que recebeu salina ip. Uma hora depois, todos os animais receberam uma massagem suprapúbica para induzir a eliminação de urina; a urina coletada durante esta primeira hora foi descartada. Depois disso, todos os animais receberam um tratamento com FURO/CAP e urina foi coletada durante outros 60 minutos para a medida das concentrações de sódio e potássio. Todos os animais receberam uma última massagem suprapúbica para eliminação da urina e foram transferidos para outra sala para imediata coleta do sangue. Sangue troncular foi coletado como descrito acima para análises bioquímicas.

Efeito do LPS na sede induzida por tratamento agudo com furosemida ou por gavagem com NaCl 2 M

Furosemida sozinha induz massiva natriurese (cerca de 1,5-2,0 mEq em uma hora) e diurese, seguida por sede dentro de duas horas (De Luca Jr e cols., 1992; Thunhorst & Jonhson, 1994; Rowland & Morian, 1999). No dia do teste, ração e líquidos foram removidos e os animais (n = 35) receberam, randomizadamente, uma injeção intraperitoneal de LPS (0,3, 0,6, 1,2 e 5 mg/kg) ou salina. Uma hora depois, todos os animais receberam uma injeção subcutânea do natriurético e diurético furosemida (10 mg/rato). Água foi oferecida em buretas

de vidro graduadas (divisões de 0,1 ml) uma hora após a injeção de furosemida. Ingestão de água foi registrada aos 15, 30, 60, 120 e 180 minutos.

Animais em outro grupo (n = 33) foram treinados para o teste com gavagem. No dia do teste, ração e líquidos foram removidos e os animais receberam, randomizadamente, uma injeção intraperitoneal de LPS (0,3, 0,6, 1,25 e 5 mg/kg) ou salina. Uma hora depois, todos os animais receberam uma gavagem de 2 ml de NaCl 2 M, que induz hipernatremia e hiperosmolalidade, com sinal de hipovolemia, dentro de uma hora [Pereira e cols., 2002]. A ingestão de água foi registrada aos 15, 30, 60, 120 e 180 minutos.

Efeito do LPS na excreção de sódio e bioquímica sanguínea após gavagem de NaCl 2 M

Um grupo de animais (n = 13) foi transferido para gaiolas metabólicas individuais, onde não tinham nem ração nem líquidos disponíveis. Este grupo foi subdividido em dois grupos, um que recebeu LPS 1,0 mg/kg ip e outro que recebeu salina. Uma hora depois, todos os animais receberam uma massagem suprapúbica para induzir a eliminação de urina; a urina coletada durante esta primeira hora foi descartada. Após isso, todos os animais receberam uma gavagem de NaCl 2 M e urina foi coletada por mais 60 minutos para a medida da concentração de sódio e potássio. Então, todos os animais receberam uma última massagem suprapúbica para eliminação da urina e foram transferidos para outra sala para imediata coleta do sangue. Sangue troncular foi coletado como descrito para análises bioquímicas.

Resultados

Efeito do LPS sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e de água induzidas por FURO/CAP

Todas as doses de LPS (0,3-5 mg/kg) exceto a menor (0,15 mg/kg) inibiram, aos 15 minutos, a ingestão não cumulativa de NaCl 0,3 M induzida por FURO/CAP [F (6, 36) = 4,0; $p < 0,05$] (Fig. 1, acima a esquerda). Não houve interação entre tratamento e tempo [F (24, 144) = 1,2; $p > 0,05$]. Dados cumulativos são mostrados na Fig. 1, acima a direita.

Apenas as doses mais altas de LPS (2,5 e 5 mg/kg) reduziram de 80 a 100% a ingestão não cumulativa de água, aos 15 minutos, comparado com salina [F (6, 36) = 3,6; $p < 0,05$] (Fig. 1, abaixo a esquerda). Não houve interação entre tratamento e tempo [F (24, 144) = 1,5; $p > 0,05$]. Dados cumulativos são mostrados na Fig. 1, abaixo a direita.

LPS (2,5 e 5 mg/kg) produziram um queda na temperatura retal ($35,2 \pm 0,1$ e $34,4 \pm 0,3$ °C, respectivamente) comparado com salina ($36,6 \pm 0,1$ °C) no tempo zero, coincidente com o começo do teste de ingestão [F (6, 36) = 3,9; $p < 0,05$]. LPS 2,5 e 5 mg/kg também produziram efeitos comportamentais caracterizados por piloereção e posição do corpo curvado com o focinho apontado para o ventre.

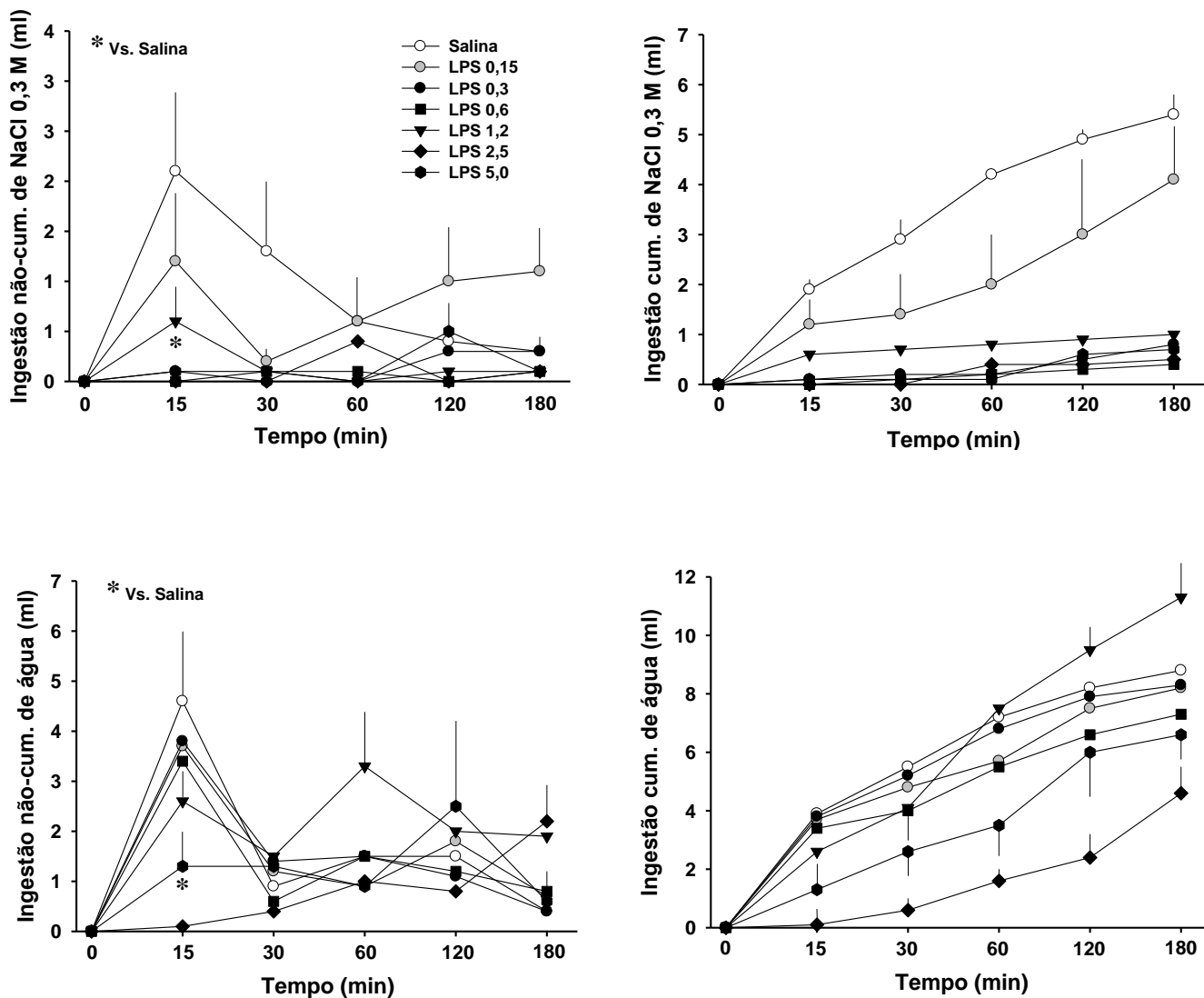


Figura 1: Ingestão não-cumulativa (esquerda) e cumulativa (direita) de NaCl 0,3 M (acima) e água (abaixo) de ratos que receberam LPS ou salina ip uma hora antes de FURO/CAP. N = 7/grupo.

Efeito do LPS na hipotensão induzida por FURO/CAP

A dose de 0,6 mg/kg foi escolhida para este teste por causa de sua efetividade em inibir apetite ao sódio mas não produzir hipotermia ou alterações na postura.

Com relação a PAM, não houve diferenças significantes entre os tratamentos (LPS 0,6 mg/kg Vs. salina) [$F(1, 5) = 0,1; p > 0,05$] e não houve interação entre tratamento e tempo [$F(14, 70) = 0,2; p > 0,05$], mas houve efeito significativo [$F(14, 70) = 4,6; p < 0,05$] na variação da pressão média com o tempo (Fig. 2, acima). Não houve também diferenças significantes entre tratamentos na frequência cardíaca [$F(1, 5) = 0,8; p > 0,05$], mas houve uma significativa mudança sobre o tempo [$F(14, 70) = 5,4; p < 0,05$] e uma interação entre tempo e tratamento nas variações da frequência cardíaca [$F(14, 70) = 2,1; p > 0,05$] (Fig. 2, abaixo).

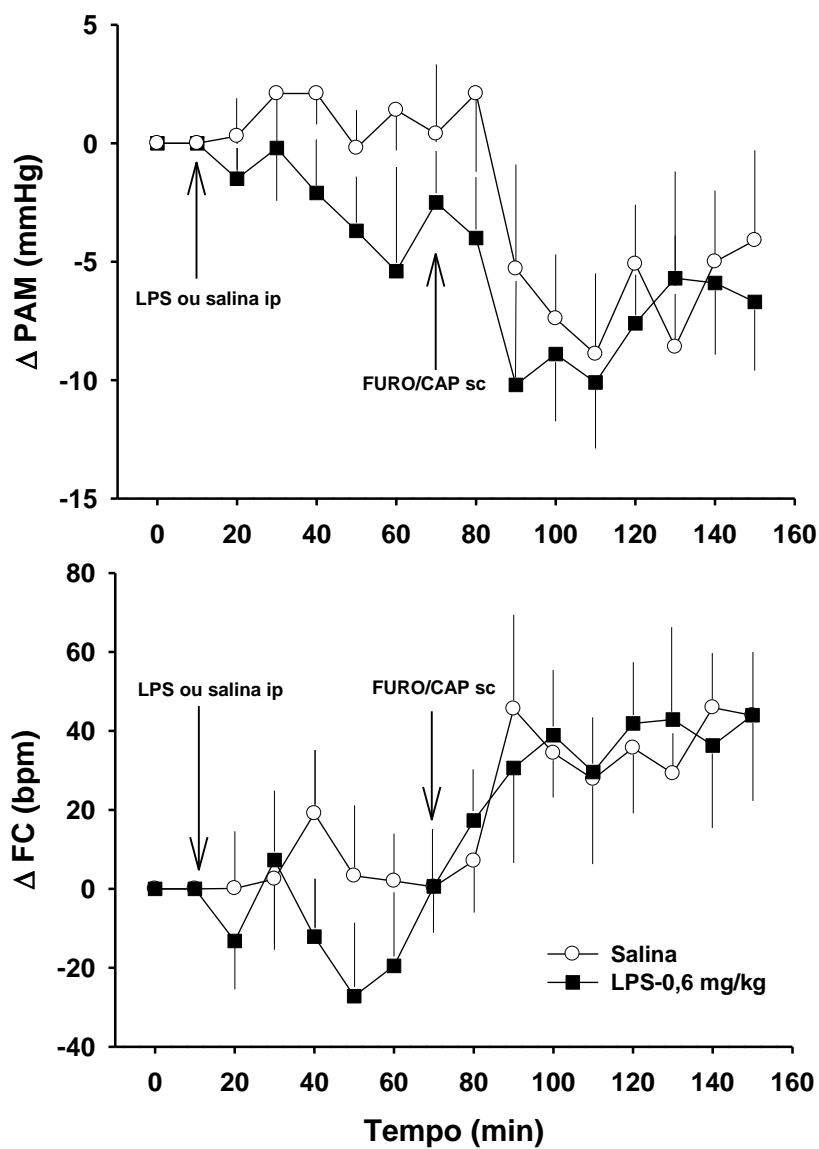


Figura 2: Variação da pressão arterial (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) de ratos que receberam LPS (0,6 mg/kg) ou salina ip uma hora antes de FURO/CAP. Setas indicam os momentos de injeções. N = 7/grupo.

Efeitos do LPS na excreção de sódio e bioquímica sanguínea em ratos tratados com FURO/CAP

LPS (0,6 mg/kg) reduziu a diurese e natriurese em 30% ($p < 0,05$) relativamente a salina, sem alterações na caliurese, em animais tratados com FURO/CAP (Tabela 1). De qualquer forma, LPS não teve efeito na concentração de sódio e potássio sérico, ou na concentração total de proteína plasmática destes animais (Tabela 1).

Tabela 1. Excreção renal e bioquímica sanguínea em ratos tratados com FURO/CAP combinado com salina ou LPS (0,6 mg/kg).

Tratamento	VU (ml/2 h)	U _{Na} V (μ Eq/2 h)	U _K V (μ Eq/2 h)	S _{Na} (mEq/l)	S _K (mEq/l)	T _p (g/%)
LPS (7)	7.1 \pm 0.8*	831 \pm 10*	300 \pm 28	140 \pm 1	6.1 \pm 0.3	6.6 \pm 0.3
Salina (6)	10.3 \pm 0.2	1187 \pm 53	451 \pm 23	141 \pm 1	5.8 \pm 0.2	7.2 \pm 0.2

Valores são média \pm E.P.M.; número de animais entre parênteses. VU, volume de urina; U_{Na}V, quantidade de sódio excretada; U_KV, quantidade de potássio excretada. S_{Na}, concentração de sódio no soro; S_K, concentração de potássio no soro; T_p, proteína total no soro. * p < 0,05 vs. Salina.

Efeito do LPS na sede induzida por tratamento agudo com furosemida ou gavagem de NaCl 2 M

Aos 15 minutos, LPS (0,3-5 mg/kg) reduziu a ingestão de água não cumulativa induzida por injeção aguda de furosemida em 30 a 80% (Fig. 3, esquerda) [F (4, 30) = 2,6; p < 0,05]. Não houve interação entre tratamento e tempo [F (16, 120) = 1,6; p > 0,05]. Dados cumulativos são mostrados na Fig. 3, direita.

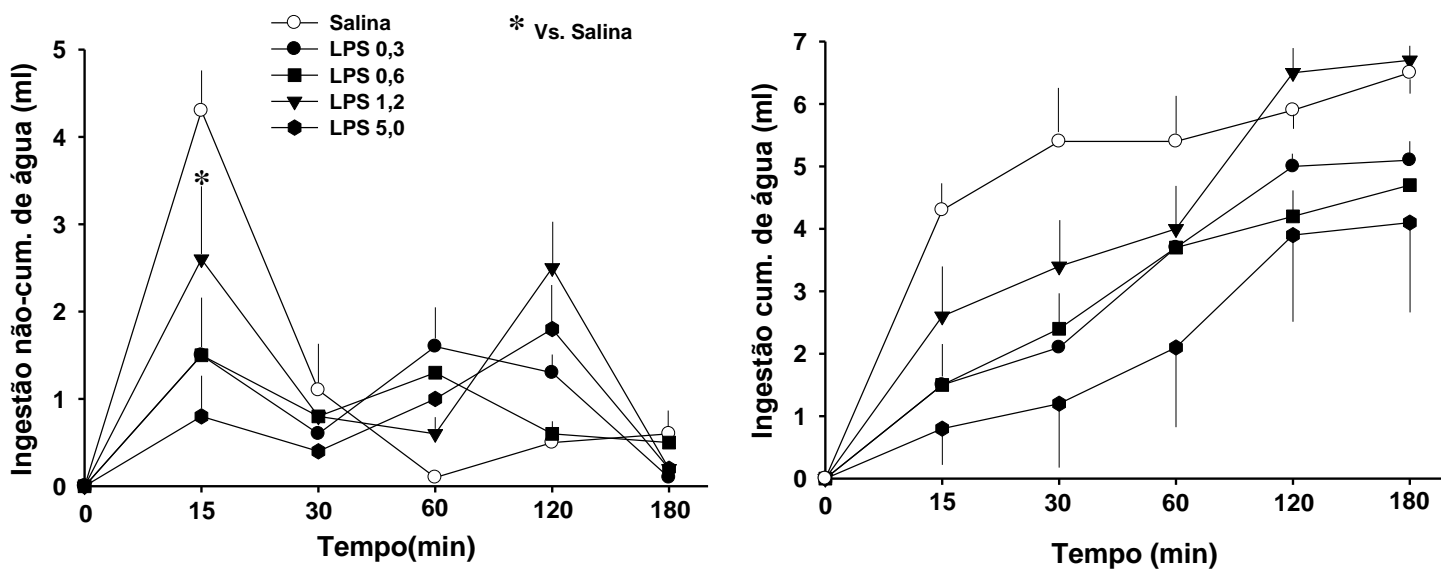


Figura 3: Ingestão não-cumulativa (esquerda) e cumulativa (direita) de água de ratos que receberam LPS ou salina ip uma hora antes de furosemida (10 mg/kg ip). N = 4 - 8/grupo.

Aos 15 minutos, LPS (0,3-5 mg/kg) reduziu a ingestão de água não cumulativa induzida por gavagem de NaCl 2 M em 60 a 100% (Fig. 4, esquerda) [F (6, 18) = 3,9; p < 0,05]. Houve interação entre tratamento e tempo [F (24, 72) = 4,4; p < 0,05]. Dados cumulativos são mostrados na Fig. 4, direita.

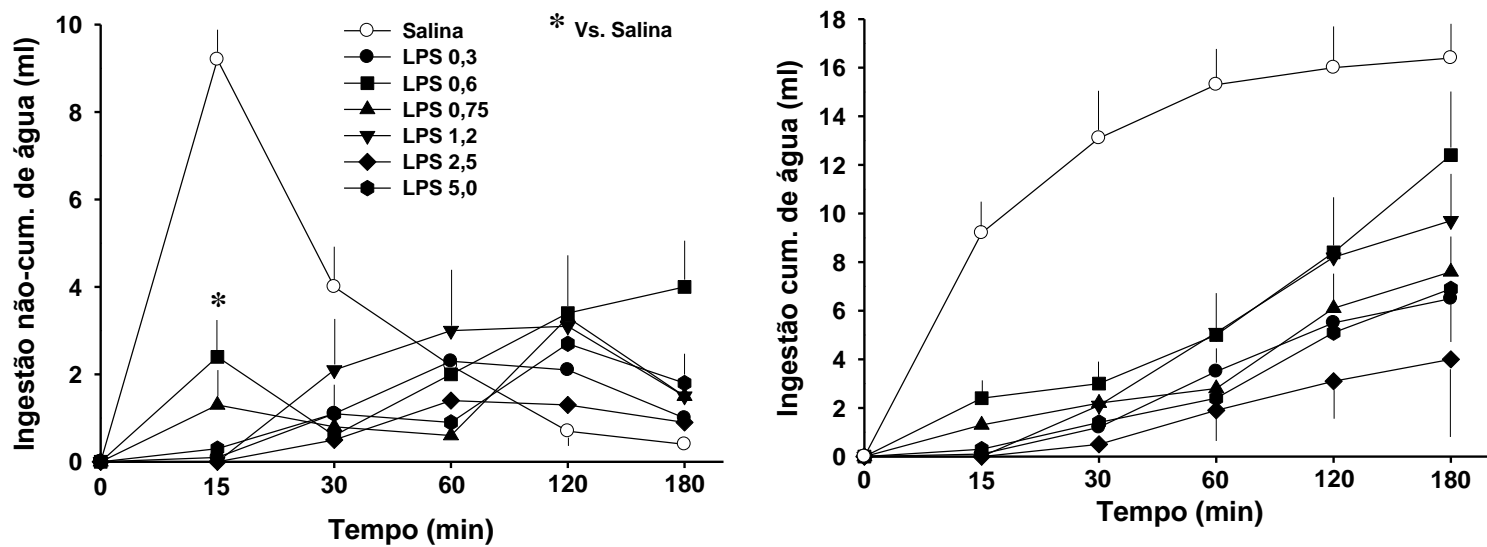


Figura 4: Ingestão não-cumulativa (esquerda) e cumulativa (direita) de água de ratos que receberam LPS ou salina ip uma hora antes de gavagem de NaCl 2 M. N = 4 - 7/grupo.

Resultados das Figuras 1, 3 e 4 que dizem respeito a ingestão de água e NaCl 0,3 M aos 15 minutos em todos os testes foram sumarizados na Figura 5. LPS aboliu principalmente a ingestão de água induzida por gavagem nas doses (0,3, 0,6, 1,2 e 5 mg/kg) mas reduziu a ingestão de água induzida por furosemida por apenas 40-80%. As mesmas doses, excetuando a maior, dificilmente tiveram algum efeito na ingestão de água induzida por FURO/CAP, embora fossem efetivas em abolir a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por este tratamento.

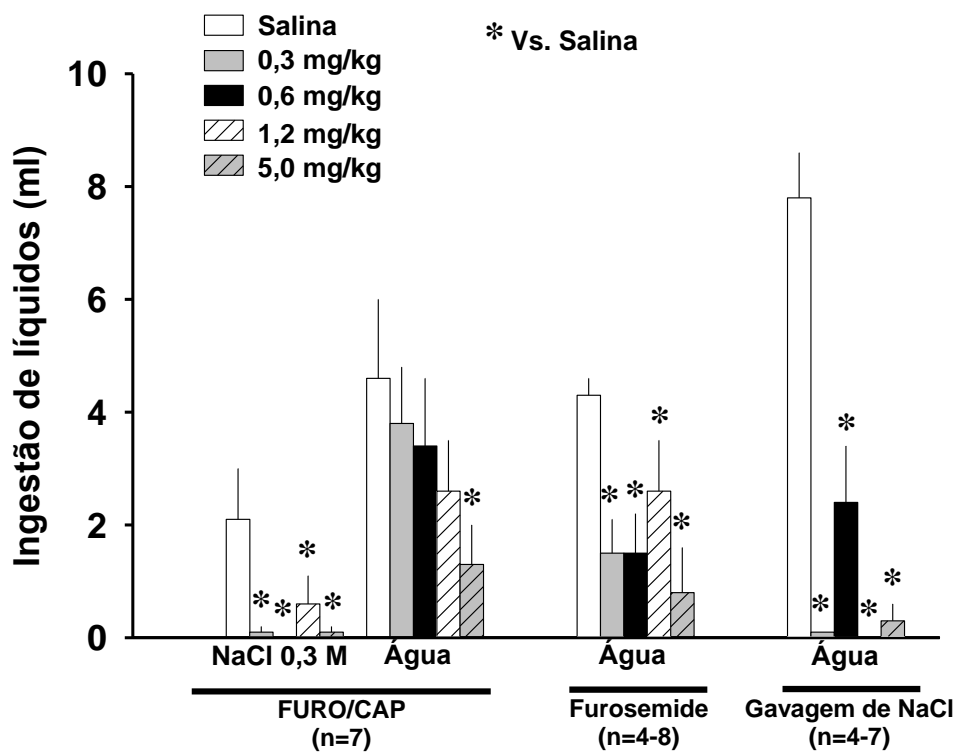


Figura 5: Efeitos do LPS na ingestão de líquidos induzida por vários métodos aos 15 minutos dos teste ingestivos (FURO/CAP, furosemida ou gavagem de NaCl hipertônico) de acordo com dados das figuras 1, 3 e 4. Número de animais entre parênteses.

Efeito do LPS na excreção de sódio e bioquímica sanguínea após gavagem de NaCl

LPS (1,0 mg/kg) reduziu a natriurese em 45% relativamente a salina ($p < 0,05$), sem alterar diurese ou caliurese (Tabela 2). LPS reduziu a concentração sérica de sódio e de proteína total, mas não teve efeito na concentração sérica de potássio (Tabela 2).

Tabela 2. Excreção renal e bioquímica sanguínea de ratos tratados com gavagem de NaCl 2 M em resposta ao LPS (1 mg/kg).

Treatment	VU (ml/2 h)	U _{Na} V (μ Eq/2 h)	U _K V (μ Eq/2 h)	S _{Na} (mEq/l)	S _K (mEq/l)	T _p (g/%)
LPS (7)	0.9 \pm 0.3	141 \pm 47*	58 \pm 17	141 \pm 1*	5.8 \pm 0.2	5.4 \pm 0,1*
Saline (6)	0.8 \pm 0.2	279 \pm 70	58 \pm 16	146 \pm 1	6.1 \pm 0.3	5.8 \pm 0.1

Valores são média \pm E.P.M.; número de animais entre parênteses. VU, volume de urina; U_{Na}V, quantidade de sódio excretada; U_KV, quantidade de potássio excretada. S_{Na}, concentração de sódio no soro; S_K, concentração de potássio no soro; T_p, proteína total no soro. * p < 0,05 vs. Salina.

Discussão

O lipopolissacarídeo (LPS) nas doses que foram de 0,3 a 5 mg/kg ip inibiu a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO/CAP. As mesmas doses também inibiram a ingestão de água induzida por furosemida sozinha ou por uma sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, enquanto apenas as doses mais altas (2,5 e 5 mg/kg) inibiram a ingestão de água induzida por FURO/CAP. LPS também reduziu volume urinário e a excreção de sódio em ratos tratados com FURO/CAP, e a excreção de sódio, concentração sérica de sódio e de proteína total em ratos que receberam NaCl 2 M por gavagem, sem produzir alteração na pressão arterial e na frequência cardíaca. As doses mais altas de LPS também induziram hipotermia e uma alteração na postura.

Os resultados sugerem que LPS não apenas inibe ingestão de água, mas também inibe ingestão de sódio. Além disso, um forte efeito inibitório sobre a ingestão de sódio foi visto com baixas doses, enquanto que o máximo efeito que o LPS produziu sobre a ingestão de água foi visto apenas com as duas doses mais altas. Assim, os resultados também sugerem que o efeito inibitório pode predominar sobre a ingestão de sódio quando os animais têm a opção entre solução sódica e água para ingerir.

O efeito do LPS na ingestão de água induzida por FURO/CAP foi de certo modo replicado quando sede foi induzida por furosemida. Ambos os resultados são consistentes com uma inibição da sede mediada por angiotensina II (Schiffing e Genest, 1982; Fitts e Masson, 1989; Thunhorst e Johnson, 1994; Rowland e Morian, 1999; Johnson, 2007). De qualquer forma, doses de LPS que efetivamente aboliram sede induzida por gavagem também não tiveram efeito ou apenas parcialmente inibiram a sede induzida por FURO/CAP ou furosemida. Assim, juntos, esse resultados sugerem que LPS possui um efeito inibitório mais forte sobre a sede intracelular do que sobre a sede extracelular.

Os resultados indicam que os efeitos do LPS sobre a sede não são exatamente os mesmos que aqueles mostrados com interleucina-1 β administrada sistemicamente, qual parece ser exclusiva para a sede (Osaka e cols., 1992). Então, a antidipsogênese pode resultar da ativação pelo LPS de outros fatores como óxido nítrico, prostaglandinas, e possivelmente, TNF α (Calapai e cols., 1992; Foca e cols., 1985; Nava e Carta, 2000). Relembrando que injeção intracerebroventricular (icv) de interleucina-1 β inibe todos os tipos de sede (Luz e cols., 2009). Além disso, LPS também inibe sede induzida por injeção icv tanto de angiotensina II como de NaCl hipertônico (Foca e cols., 1983). Assim, é possível que o LPS exerça efeitos na sede por afetar separadamente a produção central e sistêmica de interleucinas.

Além das citocinas, o efeito inibitório do LPS sobre a ingestão de fluídos pode também resultar de ativação de hormônios inibitórios e neurotransmissores. LPS induz secreção de ocitocina (Carnio e cols., 2006) dependente de ativação de órgãos circumventriculares associada com uma ativação geral do núcleo paraventricular do hipotálamo [Borges & da Rocha, 2006]. A ocitocina secretada na circulação tem sido sugerida como um marcador para atividade da ocitocina central, a qual pode interagir com receptores adrenérgicos α_2 para inibir o apetite ao sódio [Stricker & Verbalis, 1996; Sato e cols., 1997].

Ratos normovolêmicos excretam cerca de 130 μ Eq/h de sódio (Pereira e cols., 2002) e então, comparado com esta excreção, ambos FURO/CAP e sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M induziram uma natriurese substancial em animais que receberam salina no presente estudo. Natriurese induzida por FURO/CAP é claramente um resultado da furosemida, que bloqueia reabsorção de sódio na alça de Henle (Reyes e Tylor, 1999). Natriurese induzida por gavagem de NaCl hipertônica poderia resultar da redução na PRA ou pressão arterial aumentada (Bie, 2009). Uma sobrecarga ig de NaCl 2 M fortemente reduz PRA (Pereira e cols., 2002), mas dificilmente altera pressão arterial no rato (Blanch, comunicação pessoal). A hipertonidade

que resulta da gavagem pode também induzir secreção de ocitocina, um hormônio natriurético que inibe reabsorção de sódio (Antunes-Rodrigues e cols., 2004).

LPS inibiu a natriurese induzida por FURO/CAP e gavagem de NaCl 2 M. Esta antinatriurese pode ser resultado de diminuição da taxa de filtração glomerular (Schmidt, 2007; Nitescu e cols., 2008). Esta redução na taxa de filtração glomerular é consistente com a redução na diurese induzida por FURO/CAP. De qualquer forma, o LPS não altera diurese em resposta a gavagem, o que sugere que o efeito antinatriurético não foi dependente da redução do volume urinário, assim, o LPS pode interferir com a natriurese através de outros mecanismos do que somente a redução na taxa de filtração glomerular.

O efeito do LPS na excreção renal pode explicar, pelo menos em parte, a inibição da ingestão de fluídos em ratos tratados com FURO/CAP ou furosemida. De qualquer forma, a redução de 30% induzida pelo LPS na natriurese em resposta ao FURO/CAP não se correlaciona com a completa supressão da ingestão de sódio induzida pela mesma dose de LPS. Esta dissociação entre a intensidade da natriurese e ingestão de sódio é consistente com estudos prévios que mostram que a quantidade de sódio ingerida é maior que a quantidade de sódio eliminada quando os ratos entram no teste do apetite ao sódio 24 horas depois da injeção de furosemida (Lundy e cols., 2003). Então, a redução produzida pelo LPS nos efeitos renais da furosemida pode não completamente contar para a completa supressão da ingestão de sódio induzida por LPS.

A ausência de maiores efeitos do LPS na PAM e FC de animais tratados com FURO/CAP também não tem correlação com a redução na ingestão de fluídos. Os resultados sugerem que uma redução significativa similar na PAM, concomitante com um significativo aumento na FC, ocorre em resposta ao tratamento com FURO/CAP, como esperado (Thunhorst e Johnson, 1994; Thunhorst e cols., 1999), independentemente se os animais foram tratados ou não com LPS. Uma inibição geral do comportamento foi esperada se o LPS

debilitasse o animal devido a uma produção de forte hipotensão associada com choque (Carnio e cols., 2006), o que aparentemente não aconteceu nos presentes experimentos. Por outro lado, um leve, mas significativo aumento na hipotensão induzida por FURO/CAP poderia ter reduzido a sinalização cardiovascular inibitória que limitaria a ingestão de fluídos (Johnson, 2007), através disso permitindo a ingestão normal de água vista com a maioria das doses de LPS. Não está claro como a interação significativa entre tempo e tratamento para FC poderia ser interpretada; em todo caso, não foi visto um efeito muito forte, como mostrado pela figura 2. Então, devido ao fato de que o LPS não produziu um maior efeito na PAM e na FC nos animais tratados com FURO/CAP, nós não podemos atribuir a inibição da ingestão de fluídos nos animais tratados com FURO/CAP aos efeitos cardiovasculares do LPS.

LPS induziu simultânea redução na concentração de sódio sérica e na de proteína total em animais que receberam a sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico. Isto sugere uma expansão de volume sanguíneo e diluição do fluído extracelular, o que poderia gerar sinais para sede (Johnson, 2007). Ainda, a concentração de sódio sérica após LPS é ainda cinco unidades acima do valor de ratos normovolêmicos (Pereira e cols., 2002), o que pode contribuir para a desidratação celular (Kutscher, 1966). Os efeitos sistêmicos e ingestivos do LPS em animais tratados com FURO/CAP sugerem que expansão de volume ou diluição dos fluídos corporais não é o principal mecanismo para reduzir a ingestão de líquidos, mas nós não podemos descartar a possibilidade de que a inibição seletiva da sede celular é um resultado de um efeito direto do LPS combinado com o aparecimento de sinais inibitórios como expansão de volume sanguíneo e diluição.

O presente trabalho mostra que LPS inibe ingestão de sódio. Assim, a endotoxina pode prejudicar o balanço mineral e de líquidos corporais por reduzir não apenas a sede, mas também o apetite ao sódio. Dependendo da dose, o LPS pode inibir ingestão de sódio sem afetar a ingestão de água, sugerindo um efeito preferencial sobre o apetite ao sódio. Em

adição a isso, o LPS pode ter um efeito preferencial, mas não exclusivo na sede intracelular em comparação com a sede extracelular.

Os resultados também indicam que o LPS reduz natriurese induzida por um diurético de alça ou por uma sobrecarga de NaCl hipertônico. O efeito antinatriurético, e possivelmente o efeito antidiurético parece uma resposta inicial ao LPS que precede falha renal na septicemia ou no choque endotóxico (Schmidt, 2007; Nitescu e cols., 2008). De qualquer forma, este efeito pode ser usado para poupar água e eletrólitos, importante para a manutenção de volume normal dos compartimentos extra e intracelulares e, pelo menos em parte compensar a redução da ingestão de líquidos. Como compensação, este efeito poderia ser desejado em tempos de necessidade quando comportamento ingestivo é contido e o metabolismo é alterado para combater a infecção.

Agradecimentos

Os autores agradecem Silvana A. D. Malavolta pela assistência secretarial, Silvia Foglia, Silas P. Barbosa e Reginaldo C. Queiroz pela assistência técnica e Ana Vítor Oliveira pelo cuidado com os animais. Essa pesquisa foi fomentada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Roberto Lopes de Almeida e Juliana Constancio eram alunos matriculados no Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGFC) UFSCar-UNESP e bolsistas do CNPq e FAPESP, respectivamente. Este trabalho fez parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor do aluno Roberto Lopes de Almeida.

Referências

- Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valença MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 2004; 84:169-208.
- Bie P. Blood volume, blood pressure and total body sodium: internal signalling and output control. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 195:187-196.
- Blatteis CM. Thermoregulation in complex situations: combined heat exposure, infectious fever and water deprivation. *Int J Biometeorol* 2000; 44:31-43.
- Borges BC, da Rocha MJ. Participation of the subfornical nucleus in hypothalamicneurohypophyseal axis activation during the early phase of endotoxic shock. *Neurosci Lett* 2006; 404:227-31.
- Calapai G, Mazzaglia G, Marciano MC, Squadrito F, Altavilla D, Zingarelli B, Prosdocimi M, Caputi AP. Cloricromene antagonizes antidipsogenic effects induced by endotoxin, but not by TNF alpha, in the rat. *Life Sci* 1992; 51:2041-48.
- Carnio EC, Moreto V, Giusti-Paiva A, Antunes-Rodrigues J. Neuro-immune-endocrine mechanisms during septic shock: role for nitric oxide in vasopressin and oxytocin release. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006; 6:137-42.
- De Luca Jr LA, Galaverna O, Schulkin J, Yao SZ, Epstein AN. The anteroventral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. *Brain Res Bull* 1992; 28:73-87.
- Dunn AJ, Swergiel AH, de Beaurepaire R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29:891-909.
- Epstein AN. Epilogue: retrospect and prognosis. In: Epstein AN, Kissileff HR, Stellar, E (Editors). *The neuropsychology of thirst: new findings and advances in concepts*. Washington: V. H. Winston and Sons; 1973; p 315-32.
- Fitts, DA. Misuse of ANOVA with cumulative intakes. *Appetite* 2006; 46:100-102.
- Fitts, DA; Masson, DB. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. *Behav Neurosci* 1989; 103:865-72.
- Foca A, Matera G, Mastroeni P, Caputi AP. Evidence that prostaglandins within preoptic area (POA) may mediate the antidipsogenic effect of *Escherichia coli* endotoxin in the rat. *Circ Shock* 1985; 17:137-45.
- Foca A, Nicoletta P, Matera G, Mastroeni P, Caputi AP. Antidipsogenic effect of endotoxin in the rat. *Circ Shock* 1983; 11:341-50.
- Johnson AK. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39: 1388-1400.

Kutscher C. Effect of hypertonic saline injections and water deprivation on drinking, serum osmolality and gut water. *Physiol Behav* 1996; 1:259-68.

Lundy RF Jr, Blair M, Horvath N, Norgren R. Furosemide, sodium appetite and ingestive behavior. *Physiol Behav* 2003; 78:449-58.

Luz PA, Saraiva R, Almeida T, Fregoneze JB, De Castro E Silva E. Blockade of central kappa-opioid receptors inhibits the antidipsogenic effect of interleukin-1beta. *Neuropeptides* 2009, 43:93-103.

Nava F, Carta G. Repeated lipopolysaccharide administration produces tolerance to anorexia and fever but not to inhibition of thirst in rat. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22:943-53.

Ng QY, Lee KW, Byrne C, Ho TF, Lim CL. Plasma endotoxin and immune responses during a 21-km road race under a warm and humid environment. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37:307-14.

Nitescu N, Grimberg E, Ricksten SE, Herlitz H, Guron G. Endothelin B receptors preserve renal blood flow in a normotensive model of endotoxin-induced acute kidney dysfunction. *Shock* 2008; 29:402-409.

Osaka T, Kannan H, Kawano S, Ueta Y, Yamashita H. Intraperitoneal administration of recombinant human interleukin-1 beta inhibits osmotic thirst in the rat. *Physiol Behav* 1992; 51:1267-70.

Pereira DTB, Vendramini RC, David RB, Nozaki PN, Menani JV, De Luca Jr. LA. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. *Physiol Behav* 2002; 76:501-5.

Reyes AJ, Taylor SH. Diuretics in cardiovascular therapy: the new clinicopharmacological bases that matter. *Cardiovasc Drugs Ther* 1999; 13:371-398.

Richmond CA. Effects of hydration on febrile temperature patterns in rabbits. *Biol Res Nurs* 2001; 2:277-91.

Rowland, N. E., & Morian, K. R. Roles of aldosterone and angiotensin in maturation of sodium appetite in furosemide-treated rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1999; 276:R1453-R1460.

Sato MA, Sugawara AM, Menani JV, De Luca LA Jr. Idazoxan and the effect of intracerebroventricular oxytocin or vasopressin on sodium intake of sodium-depleted rats. *Regul Pept* 1997; 69:137-42.

Schiffirin EL, Genest J. Mechanism of captopril-induced drinking. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1982; 242:136-40.

Schmidt CS, Höcherl K, Schweda F, Kurtz A, Bucher M. Regulation of sodium transporters during severe inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1072-83.

Stricker EM, Verbalis JG. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. *Regul Pept* 1996; 66:83-85.

Thunhorst RL, Johnson AK. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. *Am J Physiol* 1994, 266:R458-R465.

Thunhorst RL, Beltz TG, Johnson AK. Effects of subfornical organ lesions on acutely induced thirst and salt appetite. *Am J Physiol* 1999, 277:R56-R65.

Zurovsky Y, Barbiro E. Hypovolemia in rats increases mortality rates following endotoxin administration. *Exp Toxicol Pathol* 2000; 52:37-42.

Manuscrito 2:

Inibição do apetite ao sódio por lipopolissacarídeo: envolvimento de receptores adrenérgicos α_2 .

¹Almeida, RL; ¹David, RB; ¹Constancio, J; ²Fracasso, JF; ¹Menani, JV; ¹De Luca Jr., LA*.

¹Departamento de Fisiologia e Patologia, FOAr e ²Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, FCFAr, UNESP, Araraquara, SP.

*** Autor para correspondência:** lucajr@foar.unesp.br

Resumo

Lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina da parede de *E. coli*, deprime o comportamento e afeta muitos aspectos do balanço hidroeletrólítico. LPS inibe sede, mas não se sabe se pode inibir também apetite ao sódio. No presente trabalho nós mostramos que LPS (0,3-5,0 mg/kg) injetado ip reduziu de um maneira dose-resposta a ingestão de NaCl 0,3 M, ou o apetite ao sódio, induzida por depleção de sódio (furosemida mais 24 h de remoção de sódio ambiente). As doses mais altas de LPS (1,2-5,0 mg/kg) também produziram uma hipotermia transitória presente no começo do teste, porém nenhuma dose produziu hipertermia. LPS também reduziu a taxa de esvaziamento gástrico de uma sobrecarga de NaCl 0,3 M dada intragastricamente por gavagem para animais depletados de sódio. Ioimbina (5 mg/kg ip), um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, não alterou pressão arterial, mas uma combinação dos dois reduziu a pressão arterial em ratos depletados de sódio. Ioimbina aboliu a inibição induzida por LPS na ingestão de NaCl 0,3 M. Os efeitos sistêmicos (gástricos e cardiovasculares) do LPS não explicam a inibição ocorrida no apetite ao sódio. Então, os resultados sugerem um papel inibitório do LPS, possivelmente mediado por receptores adrenérgicos α_2 de origem central, no apetite ao sódio.

Palavras-chave: ingestão de sódio, sede, endotoxina, ioimbina, pressão arterial, seps, comportamento de doença.

Introdução

Lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina derivada da parede da bactéria gram-negativa, desencadeia uma cascata de citocinas pro-inflamatórias como interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF α) e interferons (6, 10). Estes produtos medeiam uma série de respostas comportamentais e sistêmicas, agrupadas sob o nome de comportamento de doença (sickness behavior), o qual pode, pelo menos em parte, também ocorrer em doenças depressivas. Depressão induzida por LPS hipoteticamente pode causar redução em atividades como locomoção, interação social, fome e sede, assim alterando a produção de energia interna para aumentar a temperatura corporal e sustentar febre, um importante mecanismo para combater infecção.

Apesar da sua importância, a depressão comportamental induzida pelo LPS não é absoluta e pode flutuar de acordo com o estado motivacional que leva o animal a interagir com o ambiente (6). Assim, a reversão do estado depressivo feito pelo animal por si só, auxiliado ou não por intervenção medicamentosa, assume importância estratégica para satisfazer necessidades internas como, por exemplo, manutenção do balanço dos líquidos corporais. Em relação a essas necessidades internas, LPS inibe sede, inibe transporte de sódio pelo intestino, ativa secreção neurohipofisária, induz febre acompanhada por desidratação, pode aumentar no plasma durante exercício extenuante, e tem efeito deletério na temperatura corporal, respostas cardiovasculares e inflamação, quando a reposição apropriada do fluido é prejudicada (2, 4, 5, 9, 23, 25, 34).

Inibição da sede e da absorção de sódio leva a desidratação extracelular ou hipovolemia que agrava a condição de saúde de um animal infectado. Não se sabe se LPS promove prejuízo na habilidade de se lidar com desidratação extracelular por também inibir o apetite ao sódio. A antidipsogêese induzida por LPS é conhecida há muitos anos e é mediada por produção central de óxido nítrico, prostaglandinas e, possivelmente, TNF- α (3, 14, 15, 17,

22), mas não está claro como interleucinas medeiam o efeito antidipsogênico do LPS. Por exemplo, interleucina-1 inibe sede celular induzida por injeção sistêmica de NaCl hipertônico, e não a sede extracelular induzida por polietileno glicol ou angiotensina II (24). Isso aumenta a possibilidade de que LPS iniba apetite ao sódio. De qualquer forma, devido as suas propriedades depressivas, é também possível que LPS possa induzir essa inibição. Receptores adrenérgicos α_2 poderiam mediar esta inibição devido ao fato de também estarem envolvidos com estados depressivos, desordens imunológicas e redução no apetite ao sódio (11, 30). Além do mais, LPS ativa liberação central de noradrenalina, um ligante endógeno para receptores adrenérgicos α_2 , e esse efeito é revertido por um antagonista adrenérgico α_2 aplicado durante forte endotoxemia (10, 13, 19).

No presente trabalho nós testamos se LPS inibe apetite ao sódio induzido por uma injeção de furosemida combinada a 24 horas de remoção de sódio ambiente, e se ioimbina, um antagonista adrenérgico α_2 , reverte o efeito do LPS sobre apetite ao sódio.

Métodos

1. Animais

Ratos Holtzman pesando entre 280-320 gramas foram usados. Os animais foram mantidos em gaiolas de aço individuais e tiveram acesso livre a dieta com mais sódio que o requerido pelo animal (0.5 – 1.0%, Guabi Rat Chow, Paulínia, São Paulo, Brasil), água e solução de NaCl 0,3 M. Os ratos foram mantidos sob temperatura da sala de 23 ± 2 °C, umidade da sala de $55 \pm 10\%$ e sob ciclo claro/escuro de 12 horas com as luzes se acendendo às 7h30. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal (CEEA) e seguida as recomendações do Colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA).

2. Drogas

Lipopolissacarídeo extraído de *E. coli*, sorotipo 026:B6 (Sigma), dissolvido em salina isotônica estéril nas doses de 0,15-2,5 mg/kg de peso corporal.

Ioimbina (antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos) (Sigma), dissolvido em salina isotônica estéril nas doses de 2 e 5 mg/kg de peso corporal.

Furosemida (diurético) (Sigma) dissolvido em salina isotônica, pH = 9,0 ajustado com solução hidróxido de sódio 0,1 N na dose de 10 mg/rato.

3. Teste do apetite ao sódio

No dia anterior ao teste, ração e líquidos foram removidos e os animais receberam uma injeção subcutânea de furosemida (10 mg/rato). As gaiolas foram completamente lavadas para remoção do sódio e os animais permaneceram com água e uma dieta pobre em sódio (fubá) por 24 horas. Então, ração foi removida e os animais receberam uma injeção intraperitoneal (ip) de LPS ou salina. Uma ou duas horas depois, o bebedouro com água foi

substituído por duas buretas graduadas (divisões de 0,1 ml) contendo água e NaCl 0,3 M, respectivamente (teste do apetite ao sódio). Ingestão de água e de NaCl 0,3 M foi registrada até o final das duas horas do teste do apetite ao sódio.

4. Medida de temperatura corporal

Temperatura retal foi medida com uso de termômetro digital como descrito no Experimento 1.

5. Pressão arterial e frequência cardíaca

Em ratos anestesiados com cetamina ip (80 mg/kg de peso corporal) combinada a xilazina (7 mg/kg de peso corporal), um tubo de polietileno (PE-10 conectado a PE-50) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral para o registro da pressão arterial. O cateter arterial foi conduzido subcutaneamente e exteriorizado pelo dorso do rato. No dia seguinte, pressão arterial pulsátil, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram simultaneamente registradas em ratos não anestesiados através da conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão Statham Gould (P23Db) acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier, CB Sciences, Dover, NH, EUA) que foi conectado a um sistema de aquisição de dados no computador (modelo Powerlab 16SP, ADInstruments, Castle Hill, Austrália).

6. Estatísticas

Dados foram analisados usando análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) apropriada às análises individuais. Uma probabilidade menor que 0,05 foi requerida para definir significância. Comparações foram feitas usando o teste de Student-Newman-Keuls. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

7. Protocolos

7.1. Teste do apetite ao sódio em ratos tratados com LPS

Os animais (n = 35) foram gentilmente manipulados para medida de temperatura retal uma vez ao dia, para habituação, nos dias que precederam o teste do apetite ao sódio. No dia do teste, os animais receberam, randomizadamente, uma injeção intraperitoneal de LPS (0,3, 0,6, 1,2 ou 2,5 mg/kg de peso corporal) ou salina uma hora antes do início do teste do apetite ao sódio. Temperatura retal foi medida imediatamente antes da injeção de LPS (basal), no início do teste do apetite ao sódio, imediatamente antes do oferecimento de água e NaCl 0,3 M e duas horas após o registro da ingestão dos líquidos.

7.2. Teste do apetite ao sódio em ratos tratados com LPS combinado com ioimbina

Para testar os efeitos do LPS combinado com ioimbina, nós usamos um novo lote da mesma marca e sorotipo de LPS, mas por alguma razão desconhecida, o novo lote foi ineficaz nos estudos pilotos, houve então a necessidade de aumentar a dose de 0,6 para 2,0 mg/kg de peso corporal para obtermos efeitos comportamentais similares àqueles produzidos pelo primeiros testes.

Devido ao fato de que ioimbina combinada a LPS causou uma transitória redução na pressão arterial em ratos depletados de sódio pelo protocolo de furosemida mais remoção de sódio ambiente por 24 horas, uma redução que pode opor-se aos efeitos do LPS na ingestão de sódio, o teste do apetite ao sódio foi planejado para começar 1 hora após a injeção de LPS (período de hipertensão) ou 2 horas após a injeção de LPS quando a pressão arterial já havia retornado aos níveis basais (veja protocolo 7.3).

Para começar o teste do apetite ao sódio 1 hora depois do tratamento com LPS, os animais (n=36) foram divididos em 3 grupos, um que recebeu salina isotônica ip (SAL) e outro

grupo que recebeu ioimbina (YOH, 2 ou 5 mg/kg) ip. Quinze minutos depois, os grupos foram novamente divididos em animais que receberam salina isotônica ou LPS (2 mg/kg) ip; assim, seis grupos foram formados: SAL+SAL, SAL+LPS, YOH-2+SAL, YOH-5+SAL, YOH-2+LPS, YOH-5+LPS. O teste do apetite ao sódio começou 1 hora depois da segunda injeção.

Para começar o teste do apetite ao sódio 2 horas depois do tratamento com LPS, outros animais (n = 36) receberam as mesmas injeções ip como descrito acima e outros seis grupos foram formados: SAL+SAL, SAL+LPS, YOH-2+SAL, YOH-5+SAL, YOH-2+LPS, YOH-5+LPS. O teste do apetite ao sódio começou 2 horas depois da segunda injeção.

7.3. PAM e FC em ratos depletados de sódio tratados com LPS combinado com ioimbina

Uma leve hipotensão, que pode ser induzida por ioimbina, atenua sinais inibitórios provenientes de receptores cardiopulmonares para facilitar ingestão de fluídos (18), uma forte hipotensão, que é reportada quando do uso de relativamente altas doses de LPS (32), pode prejudicar a habilidade do animal para ingerir líquidos. Então, nós testamos os efeitos do LPS, sozinho ou combinado com ioimbina ip, na PAM e FC de animais depletados de sódio.

Um dia após a cirurgia para o implante de cânula arterial, os animais (n = 20) receberam furosemida (10 mg/rato) sc seguido de uma dieta deficiente em sódio e remoção de sódio ambiente. Vinte e quatro horas depois, água e ração foram removidos da gaiola e o cateter arterial foi conectado ao transdutor de pressão para o registro da PAM e FC nos animais não anestesiados. Uma primeira injeção de salina isotônica (SAL) ou ioimbina (YOH, 5 mg/kg) foi dada ip 10 minutos após o começo dos registros de PAM e FC. Uma segunda injeção de SAL ou LPS (2 mg/kg) foi dada ip 15 minutos após a primeira injeção. Assim,

quatro grupos foram formados: SAL+SAL, SAL+LPS, YOH+SAL e YOH+LPS. Os registros continuaram sem interrupção até 120 minutos após a segunda injeção.

7.4. Esvaziamento gástrico em ratos depletados de sódio tratados com LPS combinado com ioimbina.

LPS reduz esvaziamento gástrico (16), o que pode sinalizar saciedade e reduzir a ingestão de NaCl hipertônico (29). Ioimbina reduz o efeito do LPS na motilidade gástrica (16), o que pode explicar a recuperação da ingestão de NaCl 0,3 M. Então nós testamos os efeitos do LPS sozinho ou combinado com ioimbina sobre o esvaziamento gástrico de ratos depletados de sódio nas doses usadas no teste do apetite ao sódio.

Os animais (n = 22) foram treinados a receber uma gavagem intragástrica usando uma cânula de polietileno inserida na boca uma vez ao dia por cinco dias antes do teste. Um dia antes do teste, os ratos foram tratados com furosemida, sódio ambiente foi removido e os animais permaneceram sem alimento durante a noite. Vinte e quatro horas após o tratamento com furosemida, os ratos receberam salina isotônica (SAL) ip e ioimbina (YOH, 5 mg/kg de peso corporal) ip combinada 15 minutos depois com salina isotônica ou LPS (2 mg/kg) ip; assim, quatro grupos foram formados: SAL+SAL, SAL+LPS, YOH+SAL e YOH+LPS. Duas horas após a segunda injeção, os animais receberam uma gavagem de 3 ml de NaCl 0,3 M. Cinco minutos depois, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental de sódio (80 mg/kg de peso corporal; Cristália, Brasil) para análise do esvaziamento gástrico usando um protocolo adaptado de trabalhos prévios (20). O esôfago, numa porção proximal ao fundo gástrico, e o duodeno, em uma porção distal ao piloro, foram clampeados; o estômago foi imediatamente removido e pesado para determinar o peso total. Após isso, os estômagos foram dessecados (60 °C, durante 48-72 h) e pesados novamente para determinar o peso seco.

Nós avaliamos o esvaziamento gástrico pela medida do peso líquido total do estômago (expansão de volume gástrico mais lúmen e conteúdo da parede estomacal).

Resultados

1. Teste do apetite ao sódio em ratos tratados com LPS

LPS (0,6-2,5 mg/kg ip) reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M (Fig. 1, acima) comparado com salina [F (4, 35) = 12.3; p < 0,05]. LPS não alterou a ingestão de água (Fig. 1, abaixo) durante o teste do apetite ao sódio comparado com salina [F (4, 35) = 0,7].

Todos os grupos tiveram temperatura basal similar, mas LPS (1,2 e 2,5 mg/kg) produziu uma queda transitória na temperatura retal ($34,2 \pm 0,4$ e $33,4 \pm 0,5$, respectivamente para cada dose) comparado com salina ($35,9 \pm 0,2$ °C) apenas no começo do teste [F (5, 238) = 9,8; p < 0,05].

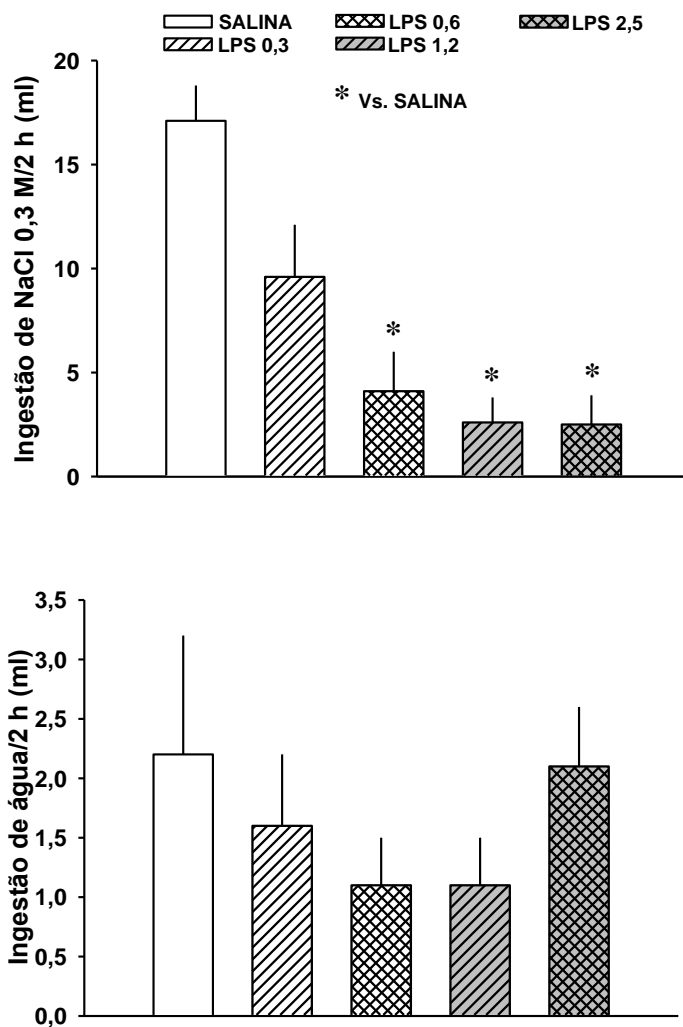


Figura 1: Ingestão de NaCl 0,3 M (acima) e água (abaixo) no teste do apetite ao sódio que começou 1 hora após injeção ip de LPS (0,3-2,5 mg/kg) ou salina. N = 7/grupo.

2. Teste do apetite ao sódio em animais tratados com LPS combinado com ioimbina.

Ioimbina (5 mg/kg) reverteu a inibição que o LPS (2 mg/kg) induziu na ingestão de NaCl 0,3 M no teste do apetite ao sódio que começou uma hora após a injeção de LPS [F (5, 30) = 11,0; $p < 0,001$] (Fig. 2, acima). Ioimbina (5 mg/kg) mais salina e ioimbina (2 and 5 mg/kg) combinada com LPS produziu um aumento na ingestão de água comparado a SAL + SAL e SAL + LPS [F (5, 30) = 4,0; $p < 0,05$] (Fig. 2, abaixo).

Ioimbina (5 mg/kg) também reverteu a inibição que o LPS (2 mg/kg) induziu na ingestão de NaCl 0,3 M no teste do apetite ao sódio que começou duas horas após a injeção de LPS [F (5, 27) = 4,8; $p < 0,05$] (Fig. 3, acima). Ioimbina mais salina produziu um aumento na ingestão de água comparado ao grupo SAL + LPS [F (5, 27) = 2,7; $p < 0,05$] (Fig. 3, abaixo).

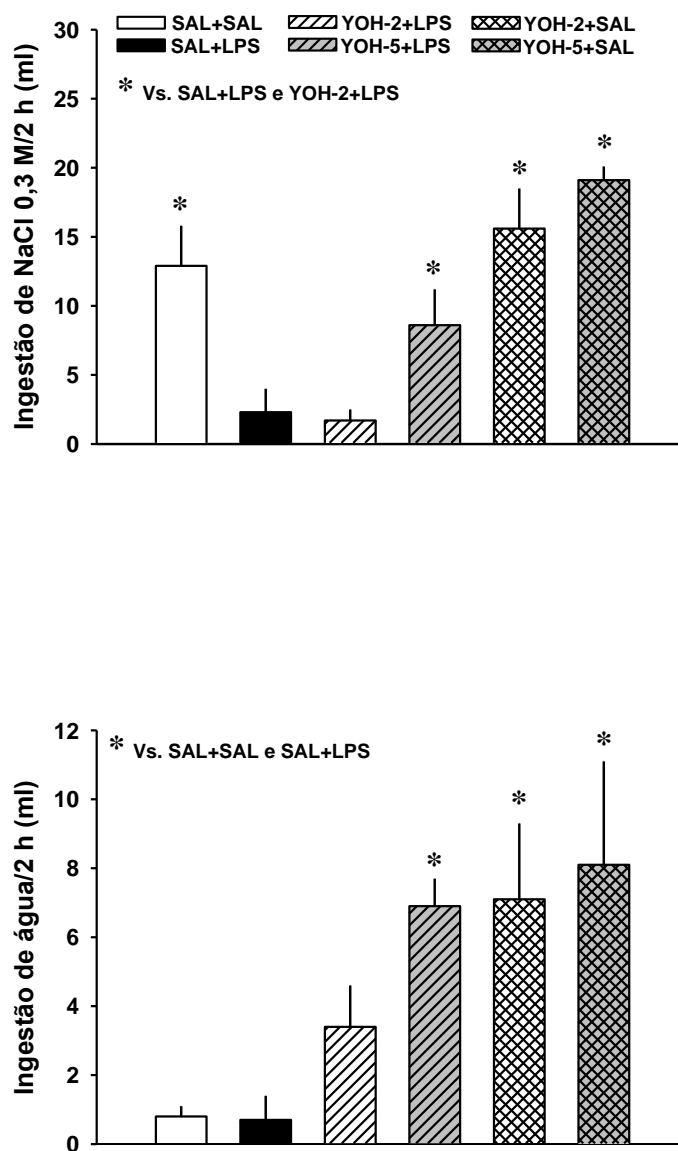


Figura 2: Ingestão de NaCl 0,3 M (acima) e água (abaixo) no teste do apetite ao sódio que começou 1 hora após a injeção ip de LPS (2 mg/kg) ou SAL. Os ratos receberam ioimbina (YOH, 2 ou 5 mg/kg) ou salina (SAL) ip 15 minutos antes de LPS ou SAL. N = 6/grupo.

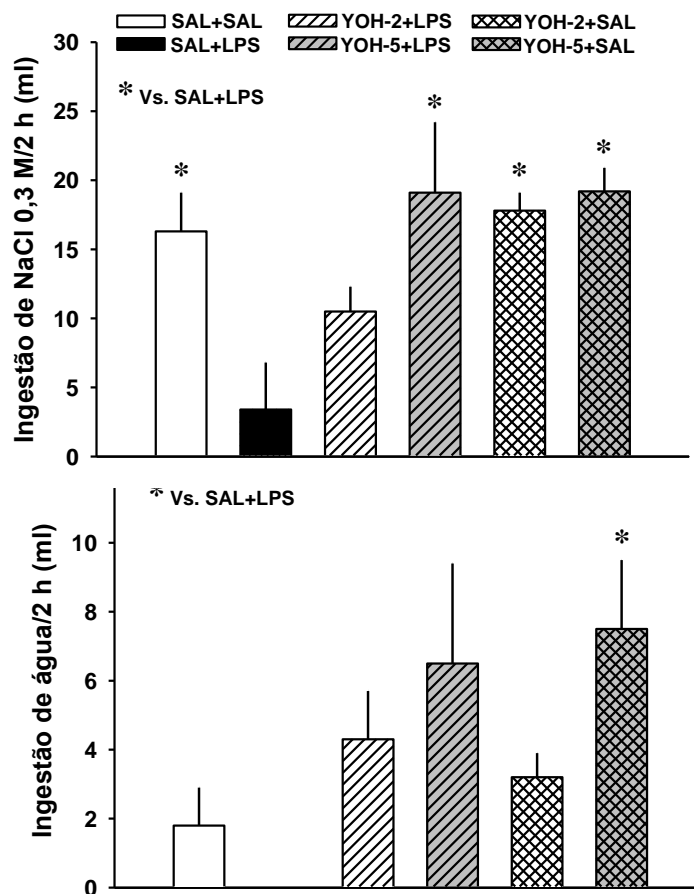


Figura 3: Ingestão de NaCl 0,3 M (acima) e água (abaixo) no teste do apetite ao sódio que começou 2 horas após a injeção ip de LPS (2 mg/kg) ou SAL. Os ratos receberam ioimbina (YOH, 2 ou 5 mg/kg) ou salina (SAL) ip 15 minutos antes de LPS ou SAL. N = 6/grupo.

3. PAM e FC em ratos depletados de sódio tratados com LPS combinado com ioimbina.

Valores de PAM e FC basais de todos os grupos foram similares aos vistos no grupo SAL + SAL (119 ± 2 mmHg e 433 ± 26 bpm, respectivamente).

LPS (2 mg/kg) ou ioimbina (5 mg/kg) sozinhos não alteraram a PAM em animais depletados de sódio, mas ioimbina combinada com LPS produziu hipotensão [F (3, 182) = 3,6; $p < 0,05$] (Fig. 4).

LPS ou ioimbina sozinhos ou combinados não produziram alterações nos valores de FC comparado ao grupo SAL + SAL (73 ± 11 bpm).

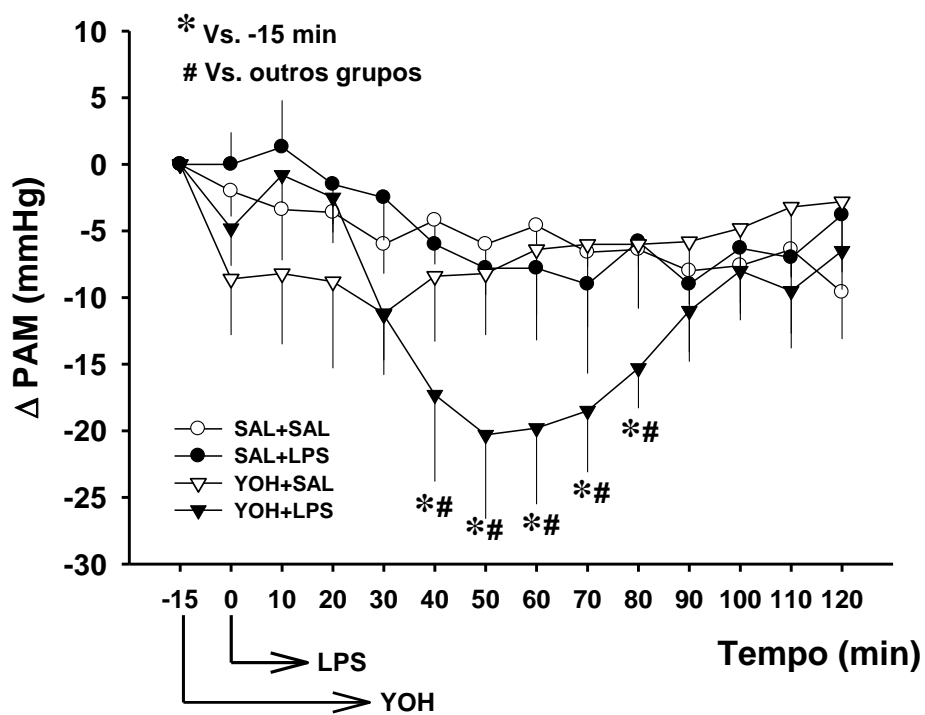


Figura 4: Variação da pressão arterial (Δ PAM) em ratos depletados de sódio por 24 horas com ioimbina (YOH, 5 mg/kg) ou salina (SAL) ip combinada com LPS (2 mg/kg) ou SAL ip (setas). N = 5/grupo.

4. Esvaziamento gástrico em ratos depletados de sódio tratados com LPS combinado com ioimbina.

LPS mais salina reduziram o esvaziamento gástrico de uma gavagem de NaCl 0,3 M medido pelo peso total de líquido estomacal ($4,4 \pm 0,4$ g vs. SAL + SAL: $2,7 \pm 0,1$ g), [F(3, 18) = 10,7; $p < 0,001$], um efeito que não foi estatisticamente diferente do grupo YOH + LPS (Figura 5). Ioimbina mais salina também não alteraram o peso total de líquido estomacal.

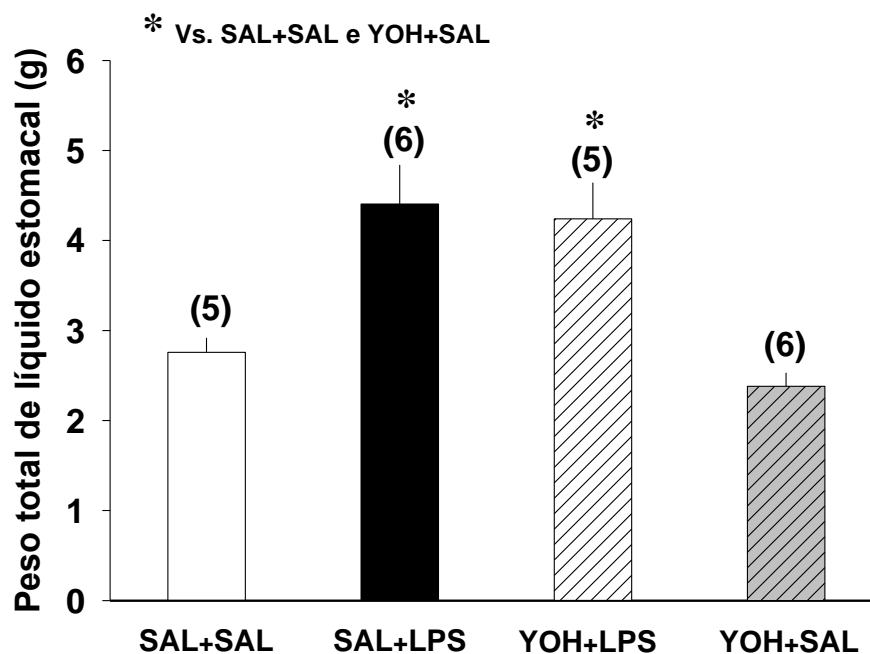


Figure 5: Peso total do líquido estomacal 5 minutos após uma sobrecarga intragástrica de NaCl 0,3 M em animais depletados de sódio tratados com ioimbina (YOH, 5 mg/kg) ou salina (SAL) ip combinada com LPS (2 mg/kg) ou SAL ip. Número de animais por grupo entre parênteses.

Discussão

Lipopolissarídeo (LPS 0,3-5,0 mg/kg ip) fortemente inibiu a ingestão de NaCl 0,3 M de ratos no teste do apetite ao sódio após injeção de furosemida combinada a remoção de sódio ambiente por 24 horas. O efeito inibitório do LPS no apetite ao sódio foi revertido em animais que receberam previamente uma injeção ip do antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , ioimbina (5 mg/kg). Transitória hipotermia induzida por doses mais altas de LPS (1,2 e 5,0 mg/kg) foi a única alteração observada na temperatura retal. LPS também inibiu o esvaziamento gástrico em animais depletados de sódio após uma gavagem de um volume fixo de NaCl 0,3 M, mas esse efeito no estômago não foi alterado pela ioimbina.

Como mencionado na introdução, o LPS pode afetar o balanço de líquidos e eletrolítico por, entre outras coisas, inibir sede. O presente trabalho esclarece o efeito do LPS sobre o controle comportamental do balanço eletrolítico e de líquidos por demonstrar que esse componente também é capaz de produzir uma inibição do apetite ao sódio. Inibição do apetite ao sódio pode interferir com o adequado balanço de líquidos e eletrólitos de um animal sob condições de sepse, mas também é consistente com a redução geral no comportamento produzido pelo LPS. Essa inibição foi mostrada por ratos em uma completa depleção de sódio induzida por injeção sistêmica do diurético furosemida seguida de remoção de sódio ambiente por 24 horas e acesso irrestrito a água para livre ingestão. Este procedimento gera um animal hipovolêmico com elevados níveis circulantes do hormônio angiotensina II e do mineralocorticóide aldosterona (27). Um sinergismo entre esses dois hormônios é o principal mecanismo facilitatório para produzir ingestão de NaCl hipertônico no animal hipovolêmico (28) e é possível que o LPS iniba o apetite ao sódio por ativar um mecanismo inibitório, como receptores adrenérgicos α_2 , que superaria o efeito do sinergismo.

Receptores adrenérgicos estão envolvidos com uma complexa interação entre LPS, citocinas, sistema nervoso simpático e neurotransmissão central noradrenérgica (11). A

inibição obtida com ioimbina sugere que LPS recruta aqueles receptores que, agindo sozinho ou em conjunto com receptores imidazólicos na porção anterior do encéfalo, medeiam a inibição produzida por muitos agonistas de receptores adrenérgicos α_2 na ingestão de água e de NaCl hipertônico (7, 30, 31). Lembrando que o LPS pode também liberar peptídeos inibitórios, como a ocitocina e o peptídeo natriurético atrial, para interagir com receptores adrenérgicos α_2 (1, 4, 29). Além disso, LPS e interleucinas induzem liberação de noradrenalina em diferentes áreas da porção anterior do encéfalo, e quando administrado exogenamente, esse agonista natural também inibe apetite ao sódio agindo em receptores adrenérgicos (10, 20, 31).

Diferentemente do sinergismo que leva muitas horas para produzir apetite ao sódio (27, 28), LPS pode recrutar um mecanismo de curta latência para o aparecimento, como por exemplo, redução no esvaziamento gástrico (30). A inibição do esvaziamento gástrico induzida pelo LPS, mostrada em prévios trabalhos (17) e no presente trabalho, ajuda no favorecimento desta hipótese porque a persistência do NaCl hipertônico no estômago pode ativar sinais de saciedade através da ativação de osmo ou mecanorreceptores encontrados na parede do estômago (31). A hipótese é de qualquer forma contraditória, visto os resultados dos experimentos com ioimbina: apesar deste antagonista de receptores adrenérgicos α_2 ter falhado em desativar a redução do esvaziamento gástrico, ele foi capaz de abolir a inibição do apetite ao sódio nos animais tratados com LPS. Este resultado contrasta com a literatura que descreve a ioimbina revertendo a inibição induzida por LPS no esvaziamento gástrico (17). A diferença dos nossos resultados poderia estar relacionada ao grau de desidratação ou a espécie de animal utilizada já que eles utilizaram camundongos normovolêmicos.

Ioimbina combinada com LPS também foi hábil em produzir hipotensão em animais depletados de sódio, um mecanismo relacionado à descarga de receptores cardiopulmonares (18) que pode ter facilitado a ingestão de sódio e o aumento na ingestão de água produzida

quando a ioimbina foi administrada sozinha. De qualquer forma, ioimbina por si não aumentou a ingestão de sódio quando os animais foram testados após a resposta hipotensora ter desaparecido, e ainda foi capaz de restaurar o apetite ao sódio. Assim, os resultados sugerem que mecanismos inibitórios sistêmicos envolvendo receptores gástricos e cardiopulmonares não medeiam o efeito antinatriorexigêncico do LPS.

As doses mais altas de LPS produziram uma hipotermia transitória em ratos depletados de sódio, um efeito também produzido pela clonidina, um agonista de receptores adrenérgicos α_2 (12). Diferentemente da clonidina, a hipotermia não foi o provável fator causal para inibir o apetite ao sódio porque essa hipotermia já havia desaparecido no momento em que os animais tiveram acesso ao NaCl hipertônico, e estava associado apenas com as doses mais altas de LPS, e é consistente com a hipotermia induzida pela ingestão de NaCl hipertônico, importante para a termogênese e recuperação do balanço de líquidos (8, 34). Assim, parece que a hipotermia e a inibição do apetite ao sódio ocorrem independente um do outro no que diz respeito a dividir os mesmos mecanismos adrenérgicos.

Os resultados presentes mostram que LPS reduz apetite ao sódio. Esta inibição comportamental pode ser resultado da ativação de um mecanismo inibitório mediado por receptores adrenérgicos α_2 , possivelmente de origem central. O entendimento desta mediação pode prover uma ferramenta adicional na pesquisa básica e clínica sobre os mecanismos que agem para combater os efeitos da endotoxina.

Agradecimentos

Os autores agradecem Silvana A. D. Malavolta pela assistência secretarial, Silvia Foglia, Silas P. Barbosa e Reginaldo C. Queiroz pela assistência técnica e Ana Vítor Oliveira pelo cuidado com os animais. Essa pesquisa foi fomentada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Roberto Lopes de Almeida, Richard B. David e Juliana Constancio eram alunos matriculados no Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGFC) UFSCar-UNESP e bolsistas do CNPq e FAPESP, respectivamente. Este trabalho fez parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor do aluno Roberto Lopes de Almeida.

Referências

- 1. Bastos R, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J.** Alphaadrenergic agonists inhibit the dipsogenic effect of angiotensin II by their stimulation of atrial natriuretic peptide release. *Brain Res* 895:80-88, 2001.
- 2. Blatteis CM.** Thermoregulation in complex situations: combined heat exposure, infectious fever and water deprivation. *Int J Biometeorol* 44:31-43, 2000.
- 3. Calapai G, Mazzaglia G, Marciano MC, Squadrito F, Altavilla D, Zingarelli B, Prosdocimi M, Caputi AP.** Cloricromene antagonizes antidipsogenic effects induced by endotoxin, but not by TNF alpha, in the rat. *Life Sci* 51:2041-2048, 1992.
- 4. Carnio EC, Moreto V, Giusti-Paiva A, Antunes-Rodrigues J.** Neuro-immune-endocrine mechanisms during septic shock: role for nitric oxide in vasopressin and oxytocin release. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6:137-142, 2006.
- 5. Ciancio MJ, Vitiritti L, Dhar A, Chang EB.** Endotoxin-induced alterations in rat colonic water and electrolyte transport. *Gastroenterol* 103:1437-1443, 1992.
- 6. Dantzer R.** Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci* 933:222-234, 2001.

- 7. De Paula PM, Sato MA, Menani JV, De Luca Júnior LA.** Effects of central alphaadrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. *Neurosci Lett* 214:155-158, 1996.
- 8. Dejima Y, Fukuda S, Ichijoh Y, Takasaka K, Ohtsuka R.** Cold-induced salt intake in mice and catecholamine, renin and thermogenesis mechanisms. *Appetite* 26:203-219, 1996.
- 9. Dorresteyn MJ, van Eijk LT, Netea MG, Smits P, van der Hoeven JG, Pickkers P.** Isoosmolar prehydration shifts the cytokine response towards a more anti-inflammatory balance in human endotoxemia. *J Endotoxin Res* 11:287-293, 2005.
- 10. Dunn AJ, Swiergiel AH, De Beaupaire R.** Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* 29:891-909, 2005.
- 11. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES.** The sympathetic nerve - an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52:595-638, 2000.
- 12. Feleder C, Perlik V, Blatteis CM.** Preoptic alpha 1- and alpha 2-noradrenergic agonists induce, respectively, PGE2-independent and PGE2-dependent hyperthermic responses in guinea pigs. *Am J Physiol* 286:R1156-R1166, 2004.
- 13. Fessler HE, Otterbein L, Chung HS, Choi AM.** Alpha-2 adrenoceptor blockade protects rats against lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1689-1693, 1996.

14. Foca A, Nicoletta P, Matera G, Mastroeni P, Caputi AP. Antidipsogenic effect of endotoxin in the rat. *Circ Shock* 11:341-350, 1983.

15. Foca A, Matera G, Mastroeni P, Caputi AP. Evidence that prostaglandins within preoptica area (POA) may mediate the antidipsogenic effect of *Escherichia coli* endotoxin in the rat. *Circ Shock* 17:137-145, 1985.

16. Hamano N, Inada T, Iwata R, Asai T, Shingu K. The alpha2-adrenergic receptor antagonist yohimbine improves endotoxin-induced inhibition of gastrointestinal motility in mice. *Br J Anaesth* 98:484-490, 2007.

17. Holmes JE, Miller NE. Effects of bacterial endotoxin on water intake, food intake, and body temperature in the albino rat. *J Exp Med* 118:649-658, 1963.

18. Johnson AK, Thunhorst RL. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* 18:292-353, 1997.

19. Linthorst AC, Reul JM. Brain neurotransmission during peripheral inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 840:139-152, 1998.

20. Manesh R, Hoffman ML, Stricker EM. Water ingestion by rats fed a high-salt diet may be mediated, in part, by visceral osmoreceptors. *Am J Physiol* 290:R1742-R1749, 2006.

- 21. Nambi P, Pullen M, Slivjak MJ, Ohlstein EH, Storer B, Smith EF.** Endotoxin-mediated changes in plasma endothelin concentrations, renal endothelin receptor and renal function. *Pharmacol* 48:147-156, 1994.
- 22. Nava F, Carta G.** Repeated lipopolysaccharide administration produces tolerance to anorexia and fever but not to inhibition of thirst in rat. *Int J Immunopharmacol* 22:943- 53, 2000.
- 23. Ng QY, Lee KW, Byrne C, Ho TF, Lim CL.** Plasma endotoxin and immune responses during a 21-km road race under a warm and humid environment. *Ann Acad Med Singapore* 37:307-314, 2008.
- 24. Osaka T, Kannan H, Kawano S, Ueta Y, Yamashita H.** Intraperitoneal administration of recombinant human interleukin-1 beta inhibits osmotic thirst in the rat. *Physiol Behav* 51:1267-1270, 1992.
- 25. Richmond CA.** Effects of hydration on febrile temperature patterns in rabbits. *Biol Res Nurs* 2:277-291, 2001.
- 26. Rowland NE, Morian KR.** Roles of aldosterone and angiotensin in maturation of sodium appetite in furosemide-treated rats. *Am J Physiol* 276:R1453-R1460, 1999.
- 27. Sakai RR, Nicolaïdis S, Epstein AN.** Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin II and aldosterone. *Am J Physiol* 251:R762-R768, 1986.

- 28. Sato MA, Sugawara AM, Menani JV, De Luca LA Jr.** Idazoxan and the effect of intracerebroventricular oxytocin or vasopressin on sodium intake of sodium-depleted rats. *Regul Pept* 69:137-142, 1997.
- 29. Stricker EM, Hoffmann ML.** Presystemic signals in the control of thirst, salt appetite, and vasopressin secretion. *Physiol Behav* 91:404-412, 2007.
- 30. Sugawara AM, Miguel TT, de Oliveira LB, Menani JV, De Luca Jr. LA.** Noradrenaline and mixed alpha 2-adrenoceptor/imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. *Brain Res* 839:227-234, 1999.
- 31. Sugawara AM, Miguel TT, Pereira DT, Menani JV, De Luca LA Jr.** Effects of central imidazolinergic and alpha2-adrenergic activation on water intake. *Braz J Med Biol Res* 34:1185-1190, 2001.
- 32. Wang Y, Novotny M, Quaiserová-Mocko V, Swain GM, Wang DH.** TRPV1 mediated protection against endotoxin-induced hypotension and mortality in rats. *Am J Physiol* 294:R1517-R1523, 2008.
- 33. Yoshida T, Okuno T, Kawabata T, Morimoto T.** Salt consumption and body fluid balance during cold exposure in rats. *Physiol Behav* 55:163-167, 1994.
- 34. Zurovsky Y, Barbiro E.** Hypovolemia in rats increases mortality rates following endotoxin administration. *Exp Toxicol Pathol* 52:37-42, 2000.

Manuscrito 3:

Envolvimento de receptores adrenérgicos α_2 centrais na inibição do apetite ao sódio induzida por lipopolissacarídeo.

Almeida, RL; Menani, JV; De Luca Jr., LA*

Departamento de Fisiologia e Patologia, FOAr, UNESP, Araraquara, SP.

* **Autor para correspondência:** lucajr@foar.unesp.br

Resumo

Prévios resultados mostram que lipopolissacarídeo (LPS) é capaz de inibir o apetite ao sódio em animais depletados de sódio por injeção de furosemida mais remoção de sódio ambiente por 24 horas. Resultados de injeção sistêmica de ioimbina, um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, sugerem que este receptor medeia a inibição do apetite ao sódio pelo lipopolissacarídeo (LPS). No presente estudo mostramos que injeção central de RX-821002 (160 nmol/1 μ l), um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , pode reverter a inibição ao apetite ao sódio provocada por LPS em animais depletados de sódio. Este antagonista combinado com LPS não produziu nenhuma alteração na pressão arterial ou na frequência cardíaca de outro grupo de animais depletados de sódio. Injeção periférica de RX-821002 também não alterou a inibição do apetite ao sódio provocada pelo LPS em ratos depletados. Esses resultados indicam que a inibição do apetite ao sódio induzida pelo LPS depende de um componente adrenérgico central atuando em receptores α_2 -adrenérgicos.

Palavras-chave: ingestão de sódio, sede, endotoxina, RX-821002, pressão arterial, sepse, comportamento de doença.

Introdução

Lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*. Uma endotoxina que induz uma forte resposta no sistema imune de mamíferos, incluindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF α que agem nas células imuno sensíveis (28). No SNC, a ativação de neurônios imuno sensíveis por injeção sistêmica de LPS provocam também ativação neurônios noradrenérgicos que estão responsáveis pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais (eixo-HPA) (11, 15, 25), modulando respostas comportamentais e sistêmicas cujo conjunto recebe o nome de comportamento de doença (sickness behavior) e essas respostas podem também ocorrer em doenças depressivas.

De acordo com o estado motivacional que o animal usa para se relacionar com o ambiente, a depressão comportamental que o LPS induz não é tão forte e pode variar (5). Então, a necessidade do animal de utilizar de meios endógenos ou exógenos para tentar reverter o estado depressivo é de importância estratégica para equilibrar as necessidades internas, como manutenção do equilíbrio hidro-eletrolítico. Além disso, o LPS inibe a sede, o transporte de sódio pelo intestino e o esvaziamento gástrico, produz ativação do eixo HPA, e induz respostas de termo-regulação e cardiovascular (2, 4, 13, 16, 21, 30).

Receptores adrenérgicos α_2 poderiam mediar esta inibição do apetite ao sódio induzida por endotoxina devido ao fato de também estarem envolvidos com estados depressivos, desordens imunológicas e redução no apetite ao sódio (5, 8, 9). Estudos mostram a presença e importância da atuação de receptores adrenérgicos nas respostas de controle da ingestão hidromineral. Sugawara e cols. (26) mostraram que a injeção direta de noradrenalina em áreas prosencefálicas tipicamente reduz de forma dose-dependente tanto a ingestão de água como a de sódio, mas não a ingestão de alimento. A noradrenalina, um ligante endógeno sem característica imidazólica, injetada icv também inibe a ingestão de água e de sódio, um efeito antagonizado pelo pré-tratamento com idazoxan, um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos e imidazólicos (27), confirmando a participação dos receptores α_2 -adrenérgicos localizados em áreas prosencefálicas na inibição da ingestão de água e de sódio. Assim, os prévios estudos confirmaram a participação dos receptores adrenérgicos α_2 localizados em áreas prosencefálicas na inibição da ingestão de água e de sódio (6, 7, 8, 14, 20, 31).

Além do mais, o LPS ativa liberação central de noradrenalina, um ligante endógeno para receptores adrenérgicos α_2 , e esse efeito é revertido por tratamento prévio com um antagonista adrenérgico α_2 (9, 12, 18).

No presente trabalho nós testamos se LPS inibe apetite ao sódio induzido por uma injeção de furosemida combinada a 24 horas de remoção de sódio ambiente, e se RX-821002, um antagonista adrenérgico α_2 , injetado intracerebroventricularmente (icv) ou intraperitonealmente (ip) reverte o efeito do LPS sobre apetite ao sódio.

Métodos

Animais

Ratos Holtzman pesando entre 280-320 gramas foram usados. Os animais foram mantidos em gaiolas de aço individuais e tiveram acesso livre a dieta com mais sódio que o requerido pelo animal (0.5 – 1.0%, Guabi Rat Chow, Paulínia, São Paulo, Brasil), água e solução de NaCl 0,3 M. Os ratos foram mantidos sob temperatura da sala de 23 ± 2 °C, umidade da sala de $55 \pm 10\%$ e sob ciclo claro/escuro de 12 horas com as luzes se acendendo às 7h30. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal (CEEA) e seguida as recomendações do Colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA).

Cirurgia cerebral

Os ratos foram anestesiados com cetamina ip (80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos ratos. Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de introdução da cânula de aço inoxidável nas cabeças dos ratos. Nesse ponto foi feita trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Para o VL (ventrículo lateral), uma cânula de aço inoxidável (12 x 0,5 mm d.i.) foi posicionada bilateralmente no cérebro conforme as coordenadas: 0,3 mm caudal ao bregma, 1,6 mm lateral à linha mediana e 3,5 mm abaixo da dura-máter. A cânula foi posicionada 2 mm acima do VL e fixada na cabeça dos ratos com parafusos e resina acrílica. Mandris metálicos foram utilizados para obliteração da cânula. Os ratos receberam injeções profiláticas de penicilina (20.000 unidades, via intramuscular). Diariamente os ratos foram manipulados e treinados com manobras utilizadas durante os procedimentos experimentais. Os experimentos foram realizados 5-7 dias após o implante das cânulas no VL.

Injeções centrais

O fármaco utilizado foi dissolvido em solução salina fisiológica e foi injetado no cérebro dos ratos utilizando-se uma seringa Hamilton (10 µl), conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada no cérebro. A cânula injetora (0,3 mm diâmetro) foi 2 mm mais longa do que a cânula guia. O volume de injeção no VL foi 1 µl.

Drogas

Lipopolissacarídeo extraído de *E. coli*, sorotipo 026:B6 (Sigma), dissolvido em salina isotônica estéril na dose de 2 mg/kg de peso corporal.

RX-821002 (antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos) (Sigma), dissolvido em salina isotônica estéril nas doses de 80 e 160 nmol/1 µl para injeção no VL e na dose de 160 nmol/1 ml para injeção ip.

Furosemida (diurético) (Sigma) dissolvido em salina isotônica, pH=9,0 ajustado com solução hidróxido de sódio 0,1 N na dose de 10 mg/rato.

Teste do apetite ao sódio

No dia anterior ao teste, ração e fluídos foram removidos e os animais receberam uma injeção subcutânea de furosemida (10 mg/rato). As gaiolas foram completamente lavadas para remoção do sódio e os animais permaneceram com água e uma dieta pobre em sódio (fubá) por 24 horas. Então, ração foi removida e os animais receberam uma injeção intraperitoneal (ip) de LPS ou salina. Uma ou duas horas depois, o bebedouro com água foi substituído por duas buretas graduadas (divisões de 0,1 ml) contendo água e NaCl 0,3 M, respectivamente (teste do apetite ao sódio). Ingestão de água e NaCl 0,3 M foi registrada até o final das duas horas do teste do apetite ao sódio.

Pressão arterial e frequência cardíaca

Em ratos anestesiados com quetamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada a xilazina (7 mg/kg de peso corporal), um tubo de polietileno (PE-10 conectado a PE-50) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral para o registro da pressão arterial. O cateter arterial foi conduzido subcutaneamente e exteriorizado pelo dorso do rato. No dia seguinte, pressão arterial pulsátil, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram simultaneamente registradas em ratos não anestesiados através da conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão Statham Gould (P23Db) acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier, CB Sciences, Dover, NH, EUA) que foi conectado a um sistema de aquisição de dados no computador (modelo Powerlab 16SP, ADInstruments, Castle Hill, Austrália).

Estatísticas

Dados foram analisados usando análise de variância (one ou two-way ANOVA) apropriada às análises individuais. Uma probabilidade menor que 0,05 foi requerida para definir significância. Comparações foram feitas usando o teste de Student-Newman-Keuls. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

Protocolos

Efeito do RX-821002, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , no efeito antinatriorexigênico do LPS no teste do apetite ao sódio

Apetite ao sódio é mediado por um sinergismo entre angiotensina II e aldosterona e aparece muitas horas após diurese, natriurese e aparecimento de hipovolemia induzidas por furosemida (23, 24). O importante ponto para o presente experimento é que testando o LPS cerca de 24 horas após a injeção de furosemida, ele não deve interferir com nenhuma conseqüência imediata induzida pelo diurético. Então, o sinergismo angiotensina II/aldosterona já teria ativado completamente os circuitos responsáveis pelo apetite ao sódio no momento em que os animais recebessem o LPS.

Muitos agonistas de receptores adrenérgicos α_2 agem no cérebro para ingestão de água e sódio e este efeito é inibido por antagonistas de receptores α_2 -adrenérgicos (26, 27). Resultados prévios mostram que injeção sistêmica de um antagonista α_2 -adrenérgico abole a inibição causada por LPS sobre a ingestão de sódio. O principal objetivo do presente experimento foi testar se RX-821002 injetado icv ou ip inibe o efeito do LPS sobre o apetite ao sódio.

Ração e fluídos foram removidos e os animais (n = 37) receberam uma injeção subcutânea de furosemida (10 mg/rato). As gaiolas foram lavadas para a completa remoção do sódio e os animais foram mantidos com água e dieta pobre em sódio (fubá) disponíveis pelas 24 horas seguintes. Então, a ração foi removida e os animais foram divididos em 3 grupos, um que recebeu salina isotônica ip (SAL) e outro grupo que recebeu RX-821002 (RX, 80 ou 160 nmol/1 μ l) icv. Quinze minutos depois, os grupos foram novamente divididos em animais que receberam salina isotônica ou LPS (2 mg/kg) ip; assim, seis grupos foram formados: SAL+SAL, SAL+LPS, RX-80+SAL, RX-160+SAL, RX-80+LPS, RX-160+LPS. Duas horas depois, o bebedouro de água foi substituído por duas buretas de vidro graduadas (divisões de 0,1 ml) contendo água e NaCl 0,3 M, respectivamente. Medidas da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram registradas por duas horas (teste do apetite ao sódio). Assim, o teste do apetite ao sódio teve início duas horas após a injeção de LPS.

Outro grupo de animais (n = 32) teve a ração e os fluídos removidos e recebeu uma injeção subcutânea de furosemida (10 mg/rato). As gaiolas foram lavadas para a completa remoção do sódio e os animais foram mantidos com água e dieta pobre em sódio (fubá) disponíveis pelas 24 horas seguintes. Então, a ração foi removida e os animais foram divididos em 2 grupos, um que recebeu salina isotônica ip (SAL) e outro grupo que recebeu RX-821002 (RX, 160 nmol/0,2 ml) ip. Quinze minutos depois, os grupos foram novamente divididos em

animais que receberam salina isotônica ou LPS (2 mg/kg) ip; assim, quatro grupos foram formados: SAL+SAL, SAL+LPS, RX-160+SAL, RX-160+LPS. Duas horas depois, o bebedouro de água foi substituído por duas buretas de vidro graduadas (divisões de 0,1 ml) contendo água e NaCl 0,3 M, respectivamente. Medidas da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram registradas por duas horas (teste do apetite ao sódio). Assim, o teste do apetite ao sódio teve início duas horas após a injeção de LPS.

Efeitos do RX-821002 icv e LPS sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em animais depletados de sódio

Além das alterações que o LPS causa na temperatura corporal, endotoxina e antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos afetam outras funções sistêmicas, como função cardiovascular, que pode contribuir para os efeitos do LPS na ingestão de fluídos.

Uma forte hipotensão induzida por LPS (33) poderia prejudicar a ingestão de fluídos pelo animal. Foi mostrado que ioimbina causa moderada hipotensão, o que atenua sinais inibitórios provenientes dos receptores cardiopulmonares (17). Assim, o efeito facilitatório que aparece após administração do antagonista α_2 -adrenérgico poderia reverter a inibição produzida pelo LPS se essa hipotensão moderada predominar, o que justifica a necessidade de se testar o efeito do RX-821002, outro antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, sobre as respostas cardiovasculares.

Assim, o objetivo deste experimento foi descobrir se LPS e RX-821002 produzem alterações sistêmicas nos protocolos usados especificamente no presente estudo, o que poderia explicar seus efeitos na ingestão de líquidos, particularmente na ingestão de NaCl 0,3 M.

5-7 dias depois da cirurgia para implante de cânula no VL, os animais (n = 22) foram preparados para registros cardiovasculares como descrito no item 6. Um dia após a cirurgia, ração e fluídos foram removidos e os animais receberam uma injeção subcutânea de furosemida (10 mg/rato). As gaiolas foram lavadas para a completa remoção do sódio e os animais foram mantidos com água e ração pobre em sódio (fubá) disponíveis pelas 24 horas seguintes. Após isso, os animais foram transferidos para a sala de registro cardiovascular. Após 30 minutos nesta sala, água e ração foram removidos e o cateter conectado ao transdutor de pressão com o animal mantido dentro de sua caixa. PAM e FC foram registradas por 10 minutos. Então, os animais foram divididos em dois grupos, um que recebeu salina isotônica icv (SAL) e outro que recebeu RX-821002 (RX, 160 nmol/1 μ l) icv. Os registros cardiovasculares persistiram por 15 minutos quando os grupos foram novamente subdivididos em animais que receberam salina isotônica ou LPS ip (2 mg/kg); assim, quatro grupos foram

formados: SAL+SAL, SAL+LPS, RX-160+SAL e RX-160+LPS. Os registros continuaram sem interrupção por mais 120 minutos.

Resultados

Efeitos do RX-821002, um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, no efeito antinatriorexigênico do LPS no teste do apetite ao sódio.

RX-821002 icv e LPS no teste do apetite ao sódio

Ingestão de NaCl 0,3 M é ilustrado na figura 1, acima. Apenas RX-821002 na dose 160 nmol/1 μ l icv reverteu a inibição da ingestão de NaCl 0,3 M induzida por LPS/Salina [F (5, 31) = 5,8; p < 0,05], enquanto RX-821002 (80 nmol/1 μ l icv) não alterou a inibição da ingestão de NaCl 0,3 M induzida por LPS. Nenhuma das doses de RX-821002 foi capaz de alterar a ingestão de água nestes grupos [F (5, 31) = 1,2; p > 0,05].

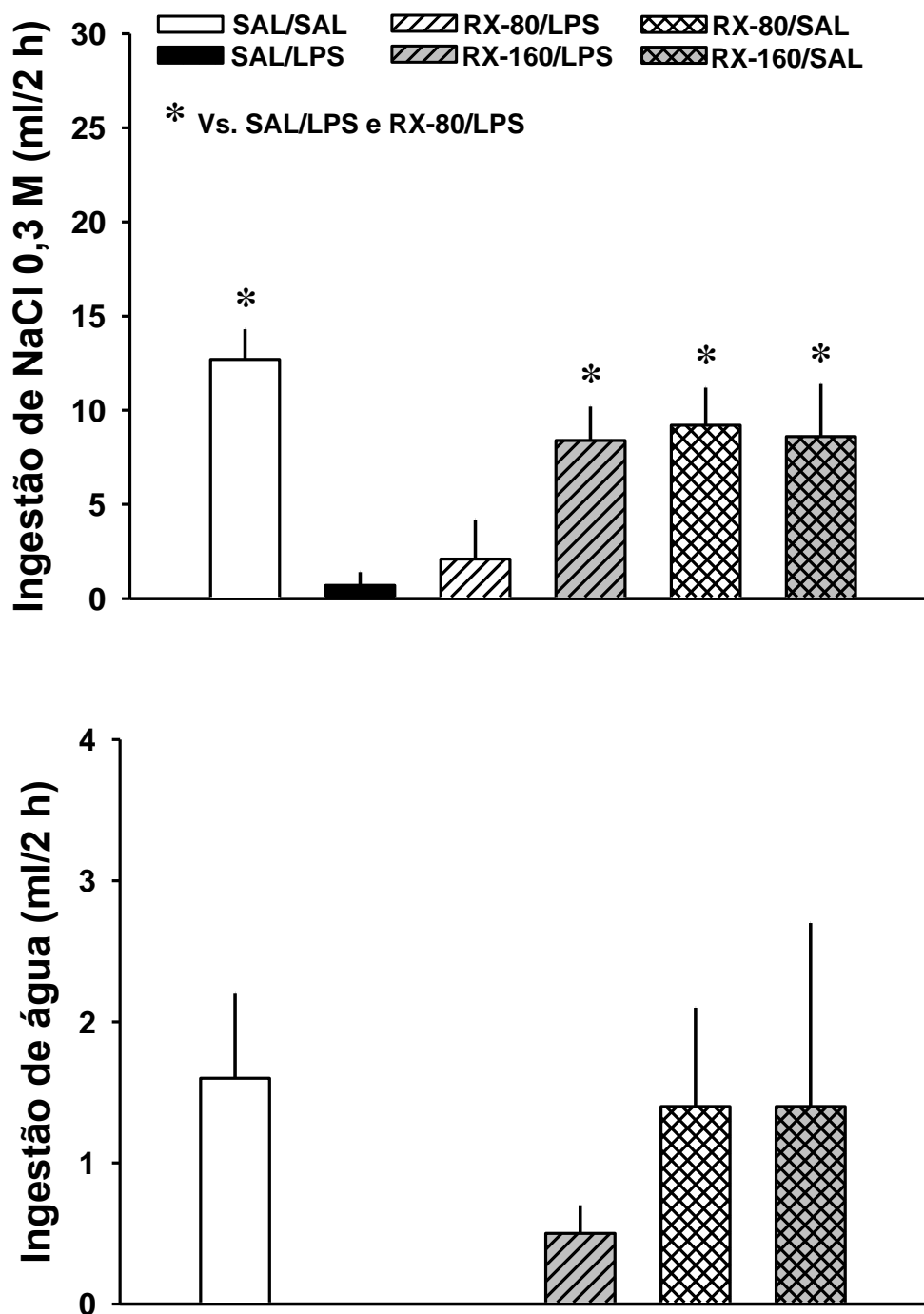


Figura 1: Ingestão de NaCl 0,3 M (acima) e água (abaixo) no teste do apetite ao sódio após a injeção ip de LPS (2 mg/kg) ou SAL. Os ratos receberam RX-821002 (RX, 80 ou 160 nmol/1 ml) ou salina (SAL) icv 15 minutos antes de LPS ou SAL. N = 6-7/grupo.

RX-821002 ip e LPS no teste do apetite ao sódio

RX-821002 (160 nmol/1 μ l icv) não alterou a inibição da ingestão de NaCl 0,3 M induzida por LPS [F (3, 28) = 2,6; p > 0,05] (figura 2, acima), nem produziu alterações na ingestão de água [F (3, 28) = 2,0; p > 0,05] (figura 2, abaixo).

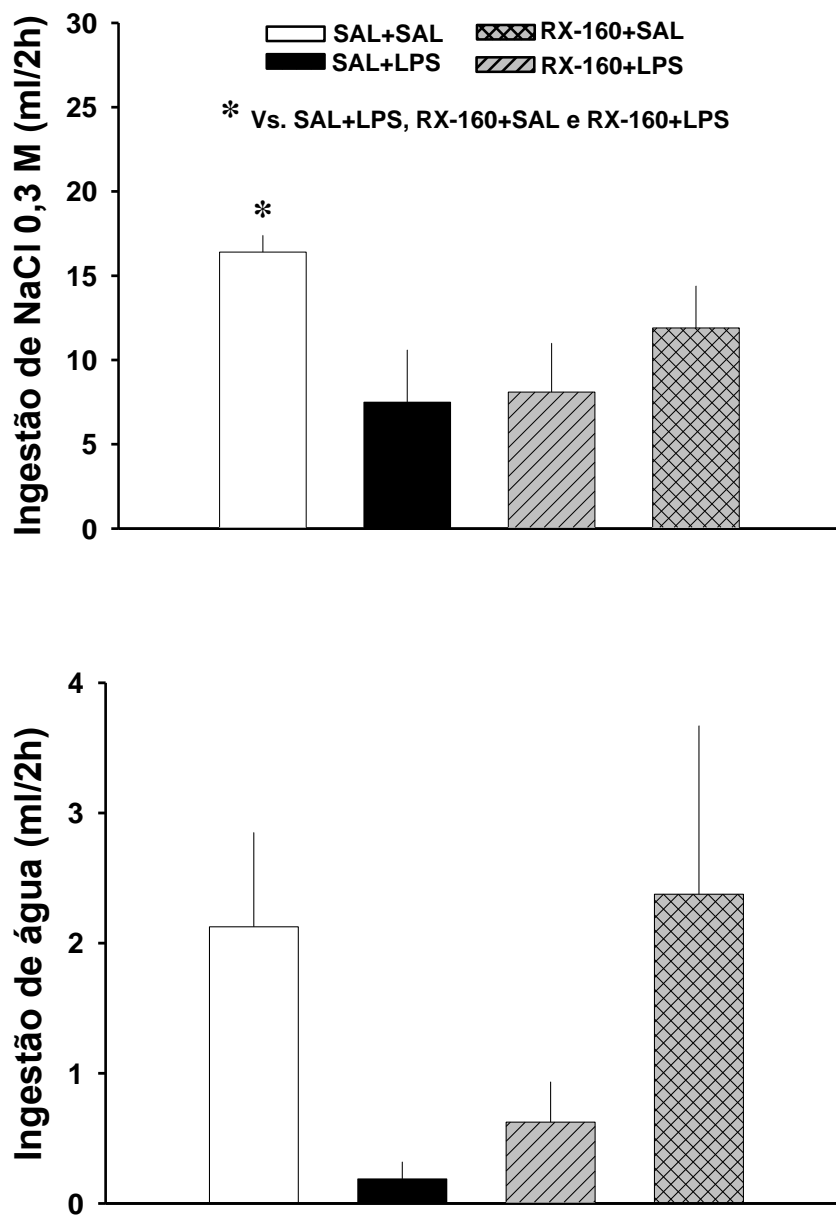


Figura 2: Ingestão de NaCl 0,3 M (acima) e água (abaixo) no teste do apetite ao sódio após a injeção ip de LPS (2 mg/kg) ou SAL. Os ratos receberam RX-821002 (RX, 80 nmol/1 ml) ou salina (SAL) ip 15 minutos antes de LPS ou SAL. N = 8/grupo.

Efeitos do RX-821002 icv e LPS sobre parâmetros cardiovasculares

Efeitos do RX-821002 e LPS sobre PAM e FC em ratos depletados de sódio

LPS (2 mg/kg ip) ou RX-821002 (160 nmol/1 µl icv) sozinhos ou combinados não alteraram a PAM (106 ± 4 mmHg) (figura 3, acima) nem a FC (396 ± 15 bpm) nos animais depletados de sódio quando comparado ao grupo SAL+SAL (figura 3, abaixo).

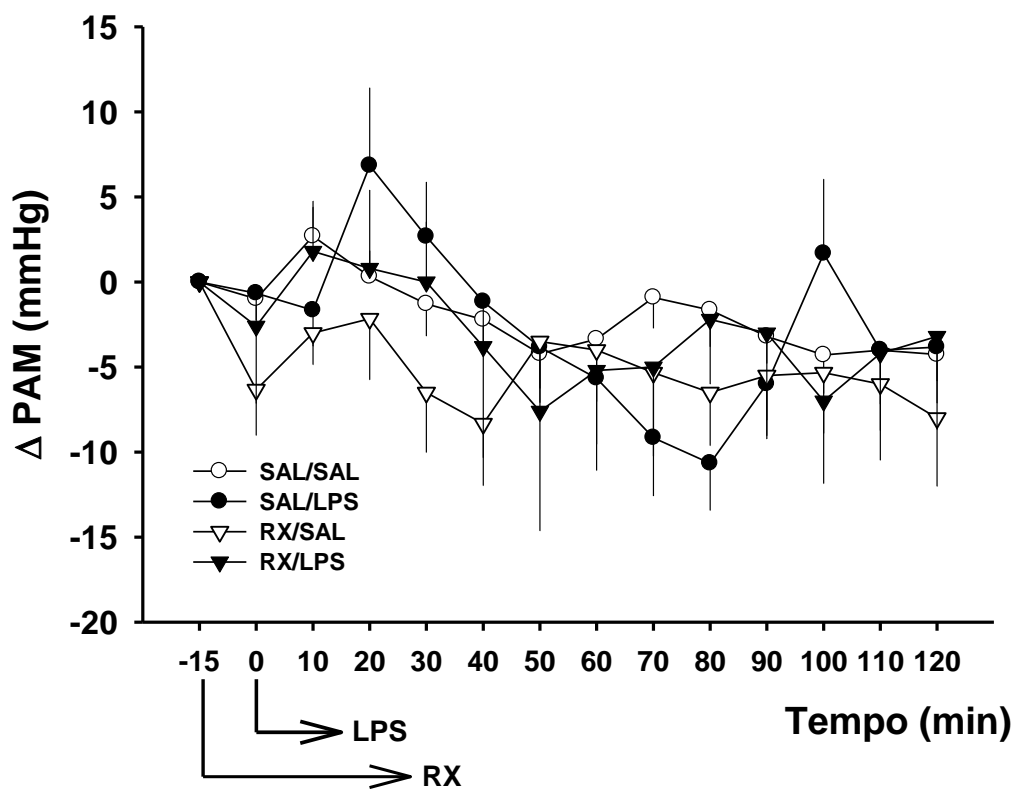


Figura 3: Variação da pressão arterial (D PAM) em ratos depletados de sódio por 24 horas com RX-821002 (RX, 180 nmol/1 ml) ou salina (SAL) icv combinada com LPS (2 mg/kg) ou SAL ip (setas). N = 5-6/grupo.

Discussão

Assim como mostrado em resultados anteriores do nosso laboratório, no presente trabalho o LPS inibiu a ingestão de NaCl 0,3 M de ratos no teste do apetite ao sódio induzida por injeção de furosemida combinada com remoção de sódio ambiente por 24 horas. Inibição do apetite ao sódio pode interferir com o adequado balanço de fluídos e eletrólitos de um animal sob condições de sepse, mas também é consistente com a redução geral no comportamento produzido pelo LPS. Essa inibição foi mostrada por ratos em uma completa depleção de sódio induzida por injeção sistêmica do diurético furosemida seguida de remoção de sódio ambiente por 24 horas e acesso irrestrito a água para livre ingestão. Neste procedimento o animal se torna hipovolêmico e apresenta elevados níveis circulantes do hormônio angiotensina II e do mineralocorticoide aldosterona (22). Um mecanismo facilitatório é gerado pelo sinergismo entre esses dois hormônios e induz uma ingestão de NaCl hipertônico no animal hipovolêmico (23). O LPS pode inibir o apetite ao sódio por ativar, entre outras coisas, um mecanismo inibitório, como receptores α_2 -adrenérgicos, que superaria o efeito do sinergismo. E realmente isso aconteceu, pois o efeito inibitório do LPS no apetite ao sódio foi abolido em animais que receberam uma injeção icv prévia do antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos RX-821002.

Administração sistêmica de LPS é um modelo amplamente usado para estudar como o sistema nervoso central organiza as respostas adaptativas endócrinas, autonômicas e comportamentais induzidas pela liberação de citocinas pró-inflamatórias. (3, 10, 15, 19, 25, 28, 32).

Prévios resultados de nosso laboratório corroboram a idéia de que o LPS é capaz de afetar o balanço eletrolítico e de fluídos. Tratamento sistêmico com LPS produziu uma inibição da ingestão de água e de NaCl 0,3 M em animais tratados com o diurético furosemida combinada a captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (FURO/CAP) e em animais depletados de sódio por injeção de furosemida mais remoção de sódio ambiente por 24 horas. Resultados no nosso laboratório mostram que um antagonista α_2 -adrenérgico injetado sistemicamente é capaz de abolir a inibição do apetite ao sódio induzida por LPS em animais depletados de sódio pelo protocolo furosemida e remoção de sódio ambiente por 24 horas. O presente trabalho esclarece que o efeito da inibição da ingestão de NaCl 0,3 M produzida pela injeção sistêmica de LPS depende de um componente noradrenérgico central por demonstrar que essa inibição é abolida quando os ratos depletados de sódio são pré-tratados com uma injeção icv de RX-821002, um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos.

Estudos já mostraram que um agonista de receptores α_2 -adrenérgicos/imidazólicos, a clonidina atuando centralmente é um potente inibidor da ingestão de sódio (6, 8, 31). Outros resultados mostraram que injeções dos antagonistas de receptores α_2 -adrenérgico RX 821002 e ioimbina aboliram o efeito inibitório da moxonidina, outro agonista de receptores α_2 -adrenérgicos sobre a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio (7). Esses resultados sugerem a participação dos receptores α_2 -adrenérgicos sobre a ingestão de sódio. A noradrenalina, um ligante endógeno, injetada icv também inibe a ingestão de sódio, um efeito antagonizado pelo pré-tratamento com idazoxan, um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos e imidazólicos (26), confirmando a participação dos receptores α_2 -adrenérgicos localizados em áreas prosencefálicas na inibição da ingestão de sódio.

Receptores α_2 -adrenérgicos estão envolvidos com uma complexa interação entre LPS, citocinas, sistema nervoso simpático e neurotransmissão central noradrenérgica (28). Resultados mostram que projeções noradrenérgicas vindas de áreas posteriores centrais para o hipotálamo são necessárias para uma completa resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais (HPA) ao um estímulo no sistema imune feito por injeção sistêmica de LPS (1).

A inibição obtida com o antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos RX-821002, sugere que LPS recruta aqueles receptores que, agindo sozinho ou em conjunto com receptores imidazólicos na porção anterior do encéfalo, medeiam a inibição produzida por muitos agonistas de receptores α_2 -adrenérgicos na ingestão de água e de NaCl hipertônico (8, 26, 27). Além disso, LPS e interleucinas induzem liberação de noradrenalina em diferentes áreas da porção anterior do encéfalo, e quando administrado exogenamente, esse agonista natural também inibe apetite ao sódio agindo em receptores adrenérgicos (18, 27).

Resultados anteriores mostraram que outro antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, a ioimbina, injetada sistemicamente e combinada com LPS foi capaz de produzir hipotensão em animais depletados de sódio, um mecanismo relacionado à descarga de receptores cardiopulmonares (17). Nos atuais resultados de injeção icv de outro antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos (RX-821002) não foi vista nenhuma alteração nos aspectos cardiovasculares, sugerindo que mecanismos que poderiam estar envolvidos no efeito antinatriorexigênico do LPS não são responsáveis pela recuperação do apetite ao sódio em animais depletados de sódio.

Os presentes resultados mostram que LPS reduz apetite ao sódio. Esta inibição comportamental pode ser resultado da ativação de um mecanismo inibitório mediado por receptores α_2 -adrenérgicos de origem central.

Agradecimentos

Os autores agradecem Silvana A. D. Malavolta pela assistência secretarial, Silvia Foglia, Silas P. Barbosa e Reginaldo C. Queiroz pela assistência técnica e Ana Vítor Oliveira pelo cuidado com os animais. Essa pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Roberto Lopes de Almeida é aluno matriculado no Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGFC) UFSCar-UNESP e bolsista do CNPq. Este trabalho é parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor do aluno Roberto Lopes de Almeida.

Referências

1. **Bienkowski MS, Rinaman L.** Noradrenergic inputs to the paraventricular hypothalamus contribute to hypothalamic-pituitary-adrenal axis and central Fos activation in rats after acute systemic endotoxin. *Neurosci* 156: 1093-1102, 2008.
2. **Borges BC, Carnio EC, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J, Branco LGS, da Rocha MJA.** Lesion of the anteroventral third ventricle (AV3V) reduces hypothalamic activation and hypophyseal hormone secretion induced by lipopolysaccharide in rats. *Brain Res* 1115: 83-91, 2006.
3. **Castanon N, Konsman, JP, Médina C, Chauvet N, Dantzer R.** Chronic treatment with the antidepressant tianeptine attenuates lipopolysaccharide-induced Fos expression in the rat paraventricular nucleus and HPA axis activation. *Psychoneuroendocrinol* 28: 19–34, 2003.
4. **Ciancio MJ, Vitiritti L, Dhar A, Chang EB.** Endotoxin-induced alterations in rat colonic water and electrolyte transport. *Gastroenterol* 103: 1437-1443, 1992.
5. **Dantzer R.** Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci* 933: 222-234, 2002.
6. **De Luca Jr LA, Menani JV.** Multifactorial control of water and saline intake: role of α_2 -adrenoceptors. *Braz J Med Biol Res* 30: 497-502, 1997.
7. **De Oliveira LB, De Luca Jr LA, Menani JV.** Moxonidine and central α_2 -adrenergic receptors in sodium intake. *Brain Res* 993: 177-182, 2003.

8. **De Paula PM, Sato MA, Menani JV, De Luca Jr LA.** Effects of central α_2 -adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. *Neurosci Lett* 214: 158, 1996.
9. **Dunn AJ, Swiergiel AH, de Beaurepaire R.** Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* 29: 891-909, 2005.
10. **Elmquist JK, Saper CB.** Activation of neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus by intravenous lipopolysaccharide. *J Comp Neurol* 374: 315-331, 1996.
11. **Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE.** A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci* 14: 897-913, 1994.
12. **Fessler HE, Otterbein L, Chung HS, Choi AM.** Alpha-2 adrenoceptor blockade protects rats against lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1689-1693, 1996.
13. **Foca A, Nicoletta P, Matera G, Mastroeni P, Caputi AP.** Antidipsogenic effect of endotoxin in the rat. *Circ Shock* 11: 341-350, 1983.
14. **Fregly MJ, Rowland N, & Greenleaf JE.** A role for presynaptic α_2 -adrenoceptors in angiotensin II-induced drinking in rats. *Brain Res Bull* 12: 393-398, 1984.
15. **Gaykema RPA, Chen CC, Goehler LE.** Organization of immuneresponsive medullary projections to the bed nucleus of the stria terminalis, central amygdala, and paraventricular nucleus of the hypothalamus: evidence for parallel viscerosensory pathways in the rat brain. *Brain Res* 1130: 130-145, 2007.

16. **Hamano N, Inada T, Iwata R, Asai T, Shingu K.** The alpha2-adrenergic receptor antagonist yohimbine improves endotoxin-induced inhibition of gastrointestinal motility in mice. *Br J Anaesth* 98: 484-490, 2007.
17. **Johnson AK, Thunhorst RL.** The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* 18:292-353,1997.
18. **Linthorst AC, Reul JM.** Brain neurotransmission during peripheral inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 840:139-152, 1998.
19. **Marvel FA, Chen CC, Badr N, Gaykema RP, Goehler LE.** Reversible inactivation of the dorsal vagal complex blocks lipopolysaccharide- induced social withdrawal and c-Fos expression in central autonomic nuclei. *Brain Behav Immun* 18:123-134, 2004.
20. **Menani JV, Sato MA, Haikel L, Vieira AA, Andrade CAF, Silva DCF, Renzi A, De Luca Jr LA.** Central moxonidine on water and NaCl intake. *Brain Res Bull* 49: 273-279, 1999.
21. **Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA, Turek VF.** Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front in Biosc* 10: 2193-2216, 2005.
22. **Rowland NE, Morian KR.** Roles of aldosterone and angiotensin in maturation of sodium appetite in furosemide-treated rats. *Am J Physiol* 276:R1453-R1460, 1999.
23. **Sakai RR, Nicolaidis S, Epstein AN.** Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin II and aldosterone. *Am J Physiol* 251:R762-R768, 1986.

24. **Sato MA, Sugawara AM, Menani JV, De Luca LA Jr.** Idazoxan and the effect of intracerebroventricular oxytocin or vasopressin on sodium intake of sodium-depleted rats. *Regul Pept* 69:137-142, 1997.
25. **Schiltz JC, Sawchenko PE.** Specificity and generality of the involvement of catecholaminergic afferents in hypothalamic responses to immune insults. *J Comp Neurol* 502: 455–467, 2007.
26. **Sugawara AM, Miguel TT, de Oliveira LB, Menani JV, & De Luca Jr LA.** Noradrenaline and mixed α_2 -adrenoceptor/imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. *Brain Res* 839: 227-234, 1999.
27. **Sugawara AM, Miguel TT, Pereira DT, Menani JV, De Luca LA Jr.** Effects of central imidazolinergic and alpha2-adrenergic activation on water intake. *Braz J Med Biol Res* 34:1185-1190, 2001.
28. **Szelényi J, Vizi ES.** The catecholamine–cytokine balance. Interaction between the brain and the immune system. *Ann NY Acad Sci* 1113: 311-324, 2007.
29. **Turnbull AV, Rivier CL.** Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79: 1-71, 1999.
30. **Wang Y, Novotny M, Quaiserová-Mocko V, Swain GM, Wang DH.** TRPV1 mediated protection against endotoxin-induced hypotension and mortality in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(5): R1517-23, 2008.

- 31. Yada MM, De Paula PM, Menani JV, De Luca Jr LA.** Central α_2 -adrenergic agonists e need-induced 3% NaCl e water intake. *Pharmacol Biochem Behav* 57, 137-143, 1997.
- 32. Zhang YH, Lu J, Elmquist JK, Saper CB.** Lipopolysaccharide activates specific populations of hypothalamic and brainstem neurons that project to the spinal cord. *J Neurosci* 20: 6578–6586. 2000.
- 33. Zurovsky Y, Barbiro E.** Hypovolemia in rats increases mortality rates following endotoxin administration. *Exp Toxicol Pathol* 52:37-42, 2000.