

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Fisiologia

EDUARDO ALVES SARAMAGO

O hidrogênio molecular potencializa a hipotermia e previne a hipotensão e a febre durante a inflamação sistêmica induzida por LPS

Ribeirão Preto
2018

EDUARDO ALVES SARAMAGO

**O hidrogênio molecular potencializa a hipotermia e previne a hipotensão e
a febre durante a inflamação sistêmica induzida por LPS**

Versão Original

Dissertação apresentada ao Programa de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP/USP, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Saramago, Eduardo Alves

O hidrogênio molecular potencializa a hipotermia e previne a hipotensão e a febre durante a inflamação sistêmica induzida por LPS/Eduardo Alves Saramago; Orientador: Luiz Guilherme de Siqueira Branco – Ribeirão Preto, 2018.

60 p. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

1. Endotoxina. 2. TNF- α . 3. IL-1 β . 4. IL-10. 5. Sepse.

SARAMAGO, Eduardo Alves. O hidrogênio molecular potencializa a hipotermia e previne a hipotensão e a febre durante a inflamação sistêmica induzida por LPS.

Dissertação apresentada ao Programa de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia.

Aprovada em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Disciplina é a ponte que liga nossos sonhos às nossas realizações.”

(TILLMAN, 2002)

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, Denair A. S. e Zanoni S..

Dedico também a minha noiva Gabriela S. B., por todo o suporte durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Durante o mestrado, aprendi a apreciar a Fisiologia e a reconhecer sua profunda importância. Gostaria de agradecer a todos que me ajudaram de maneira direta ou indireta para o sucesso na conclusão desta importante etapa.

Agradeço a Deus pela vida e pelas oportunidades concedidas.

Agradeço a minha mãe, Denair, pelas sábias palavras de incentivo, pelo carinho e suporte em todos os momentos. Ao meu pai, Zanoni Saramago, por me encorajar a buscar sempre o melhor de mim e por ser meu exemplo profissional. A ambos, pela educação. Ao meu irmão, Henrique, pelos cuidados na infância e ensinamentos.

Agradeço a minha querida noiva, Gabriela, pelos 7 anos de suporte incondicional nas mais variadas situações, pela amizade e companheirismo, pelas aventuras e por me inspirar a lutar pelos meus sonhos e ideais.

Agradeço a minha afilhada, Antonella, pela doce ternura e pelo sorriso encantador.

Agradeço a minha sogra Clarestina e meu sogro Josimar pelas conversas, apreço e cuidados.

Agradeço aos meus amigos André e Virgílio, pela longa jornada juntos e pelos momentos de alegria e descontração.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco, que abriu as portas do seu laboratório e me recebeu de forma calorosa e gentil. Serão sempre boas as lembranças das divertidas conversas e das excelentes orientações para a pesquisa e para a vida.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Neuroquímica da Inflamação Sistêmica pela convivência e pelas contribuições.

Agradeço ao Mauro da Silva, técnico do laboratório, pela ajuda durante os experimentos.

Agradeço a Universidade de São Paulo, pelas ricas oportunidades.

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto pelo trabalho desempenhado.

Agradeço a preciosa vida dos animais que fizeram parte deste trabalho.

Agradeço aos componentes da banca examinadora deste trabalho, por aceitarem o convite e estarem presentes para a avaliação.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que proveram o auxílio financeiro indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

SARAMAGO, E. A. **O hidrogênio molecular potencializa a hipotermia e previne a hipotensão e a febre durante a inflamação sistêmica induzida por LPS.** 2018. 60f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O hidrogênio molecular (H_2) exerce efeito antioxidante, anti-apoptótico e anti-inflamatório. Nesse estudo testamos a hipótese que o H_2 modula as mudanças cardiovasculares, inflamatórias e termorregulatórias na inflamação sistêmica (IS) induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em diferentes doses (0,1 ou 1,5 mg/kg, intravenoso, induzindo IS moderada ou severa) em ratos machos *Wistar* (250-300 g). LPS ou salina foi injetada imediatamente antes do início dos 360 minutos de inalação do H_2 (2% H_2 , 21% O_2 , balanceado com nitrogênio) ou ar ambiente (21% O_2 , balanceado com nitrogênio). A temperatura corporal (Tc) foi mensurada por *datalogger* pré-implantados na cavidade peritoneal. O H_2 não causou mudança nos parâmetros cardiovasculares, inflamatórios e na Tc dos ratos controle (tratados com salina). Durante a IS moderada o H_2 reduziu o surgimento das citocinas pró-inflamatórias no plasma (TNF- α e IL-6) enquanto causou um aumento da IL-10 plasmática (citocina anti-inflamatória) e previu a febre. Durante a IS severa o H_2 potencializou a hipotermia e previu a febre e a hipotensão. Além disso, o H_2 causou uma redução no surgimento das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β do plasma) e prostaglandina E₂ [(PGE₂), no plasma e no hipotálamo], e um aumento da IL-10 plasmática. Esses dados são consistentes com o entendimento que o H_2 atenua a febre na IS moderada e durante a IS severa potencializa a hipotermia, previne a hipotensão e exerce um efeito anti-inflamatório forte o suficiente para prevenir a febre alterando a sinalização febrigêntica e alterando a produção hipotalâmica de PGE₂.

Palavras-chave: Endotoxina, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, Sepse.

ABSTRACT

SARAMAGO, E. A. **Molecular hydrogen potentiates hypothermia and prevents hypotension and fever in LPS-induced systemic inflammation.** 2018. 60p. Dissertation (Masters) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Molecular hydrogen (H_2) exerts anti-oxidative, anti-apoptotic, and anti-inflammatory effects. Here we tested the hypothesis that H_2 modulates cardiovascular, inflammatory, and thermoregulatory changes in systemic inflammation (SI) induced by lipopolysaccharide (LPS) at different doses (0.1 or 1.5 mg/kg, intravenously, to induce mild or severe SI) in male Wistar rats (250–300 g). LPS or saline was injected immediately before the beginning of 360-minute inhalation of H_2 (2% H_2 , 21% O_2 , balanced with nitrogen) or room air (21% O_2 , balanced with nitrogen). Deep body temperature (T_b) was measured by dataloggers pre-implanted in the peritoneal cavity. H_2 caused no change in cardiovascular, inflammatory parameters, and T_b of control rats (treated with saline). During mild SI, H_2 reduced plasma surges of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) while caused an increase in plasma IL-10 (anti-inflammatory cytokine) and prevented fever. During severe SI, H_2 potentiated hypothermia, and prevented fever and hypotension. Moreover, H_2 caused a reduction in surges of proinflammatory cytokines (plasma TNF- α and IL-1 β) and prostaglandin E₂ [(PGE₂), in plasma and hypothalamus], and an increase in plasma IL-10. These data are consistent with the notion that H_2 blunts fever in mild SI, and during severe SI potentiates hypothermia, prevents hypotension and exerts anti-inflammatory effects strong enough to prevent fever by altering febrile signaling and ultimately down-modulating hypothalamic PGE₂ production.

Key words: Endotoxin, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, Sepsis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
CFM	Conselho Federal de Medicina
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
COXII	Cicloxygenase II
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Frequência cardíaca
Fig.	Figura
Figs.	Figuras
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Grama
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
H ₂	Hidrogênio molecular
HO-1	Heme oxigenasse - 1
IL-10	Interleucina - 10
IL-1β	Interleucia - 1β
IL-6	Interleucina - 6
ILAS	Instituto latino americano de sepse
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ip	Intraperitoneal
IS	Inflamação sistêmica
IT	Índice térmico
iv	Intravenosa
kg	Quilograma
kHz	Quilohertz

LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligramma
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
N.d.	Níveis não detectados
N ₂	Nitrogênio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear do tipo 2
O ₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
PAM	Pressão arterial média
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PAP	Pressão arterial pulsátil
pg	Picograma
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
POA	Área pré-óptica do hipotálamo
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
rpm	Rotações por minuto
sGC	Guanilato ciclase solúvel
Tbi	Temperatura basal inicial
Tc	Temperatura corporal
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
u	Unidades
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
VO ₂	Consumo de oxigênio
μm	Micrómetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão frontal da caixa acrílica selada com o animal em seu interior.....	23
Figura 2. Visão superior da caixa acrílica selada com o animal em seu interior.....	23
Figura 3. Influência do H ₂ na regulação da Tc durante a IS moderada.....	25
Figura 4. Análise dos mediadores inflamatórios plasmáticos e os efeitos do H ₂ durante a IS moderada.....	27
Figura 5. Análise da PGE ₂ na POA durante a IS moderada.....	28
Figura 6. Influência do H ₂ na PAM e FC durante a IS severa.....	30
Figura 7. Influência do H ₂ na regulação da Tc durante a IS severa.....	32
Figura 8. Análise dos mediadores inflamatórios plasmáticos e os efeitos do H ₂ durante a IS severa.....	34
Figura 9. Análise da PGE ₂ na POA durante a IS severa.....	35

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Dados epidemiológicos	14
1.2. Patogênese da sepse	15
1.2.1. Respostas cardiovasculares durante a sepse	16
1.2.2. Respostas termorregulatórias durante a sepse.....	16
1.3. Hidrogênio molecular.....	17
2 – OBJETIVOS	18
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Animais	19
3.2. Procedimentos cirúrgicos	19
3.3. Medidas da Tc, PAM e FC.....	20
3.4. Coleta de amostras do plasma	21
3.5. Coleta de amostras da POA.....	21
3.6. Medida dos níveis plasmáticos de PGE ₂	21
3.7. Medida da PGE ₂ na POA	22
3.8. Procedimentos experimentais	22
3.9. Análise estatística.....	24
4 – RESULTADOS	24
4.1. Influência do H ₂ na regulação da Tc durante a IS moderada.....	24
4.2. Análise dos mediadores inflamatórios plasmáticos e os efeitos do H ₂ durante a IS moderada	25
4.3. Análise da PGE ₂ na POA durante a IS moderada.....	28
4.4. Influência do H ₂ na PAM e FC durante a IS severa.....	28
4.5. Influência do H ₂ na regulação da Tc durante a IS severa.....	31
4.6. Análise dos mediadores inflamatórios plasmáticos e os efeitos do H ₂ durante a IS severa	33
4.7. Análise da PGE ₂ na POA durante a IS severa	35
5 – DISCUSSÃO	35
6 – CONCLUSÕES	40
7 – APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO	42
REFERÊNCIAS	53

1 – INTRODUÇÃO

Diferentes níveis de gravidade da sepse foram utilizados ao longo dos anos para definir essa condição e classificá-la, utilizando nomenclatura variada segundo a presença de diferentes sinais. As diferentes denominações e definições tornavam complicado o estabelecimento de linhas de ação para a identificação e tratamento da sepse, dificultando a recuperação do paciente, e consequentemente, reduzindo sua chance de sobrevivência. Atualmente, apenas dois conceitos são utilizados.

Os avanços no entendimento da epidemiologia da sepse e patogênese, englobando as alterações funcionais de órgãos e sistemas presentes nessa condição, bem como no seu tratamento tornaram necessário o estabelecimento de sua atual definição (SINGER et al., 2016).

O conceito mais recente foi estabelecido pelo terceiro consenso internacional para definição de sepse e choque séptico, que define a primeira como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção. O choque séptico, por sua vez, é conceituado como a condição na qual o indivíduo com sepse apresenta anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas suficientemente profundas para aumentar ainda mais o risco de morte (SINGER et al., 2016).

1.1. Dados epidemiológicos

Em todo o mundo, a sepse e sua alta mortalidade continuam sendo um desafio difícil de ser vencido em todas as regiões, independente do perfil econômico. Segundo Fleischmann e colaboradores (2016), apesar da escassez de estudos epidemiológicos em países de média e baixa renda, é possível extrapolarmos os dados provenientes dos estudos realizados em países mais desenvolvidos. Englobando a antiga classificação de sepse e sepse grave, pode-se estimar um número de 31,4 milhões de casos em países de média a baixa renda, se aplicadas às estimativas dos países desenvolvidos, tomando como base uma população global de 7,2 bilhões pessoas.

No Brasil, segundo o Instituto latino americano de sepse (ILAS) e o Conselho Federal de Medicina (CFM), estima-se que ocorram 600 mil novos casos de sepse a cada ano. Recentemente, Machado e colaboradores (2017), em um estudo observacional realizado por

um grande grupo de pesquisadores provenientes de diversos centros de pesquisa, mostraram que o número de pacientes com sepse ou choque ocupam aproximadamente 30% dos leitos das Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em nosso país, com a taxa de mortalidade alcançando 55,4%.

Mesmo com os avanços nas orientações para procedimentos de identificação e tratamento da sepse o número de casos permanece um quadro alarmante. A alta incidência e mortalidade podem ser atribuídas a diversos fatores, entre eles a infraestrutura deficiente para o atendimento desse tipo de caso em unidades de saúde, a maior resistência dos microorganismos aos medicamentos utilizados, o número maior de idosos e pacientes imunossuprimidos, reconhecidamente mais vulneráveis, dentre outros (FRACASSO, 2008).

Dada à importância e abrangência do tema, ainda são necessários estudos para a compreensão dos mecanismos que envolvem a patogênese da sepse e para o desenvolvimento de novas formas de tratamento, na tentativa de reduzir o número de óbitos devido a essa condição clínica, além da necessidade de desenvolvimento de estratégias de prevenção e informação à comunidade sobre o uso correto de medicamentos, principalmente antibióticos e melhora na infraestrutura de hospitais e postos de saúde.

1.2. Patogênese da sepse

As respostas fisiopatológicas durante a sepse são desencadeadas inicialmente pela presença de macromoléculas provenientes de microrganismos invasores, como fungos, bactérias e vírus. Os componentes desses microorganismos que são capazes de interagir com receptores nas células do hospedeiro e desencadear a resposta inflamatória são chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), e seus receptores nas células do hospedeiro são chamados de receptores de reconhecimento padrão (PRR).

Um dos modelos experimentais para estudo da sepse é a administração de Lipopolissacarídeo (LPS), também denominado de endotoxina. O LPS é um PAMP, componente da parede celular de bactérias gram-negativas, que, ao entrar na corrente sanguínea, se liga ao seu RRP, o receptor do tipo *Toll 4* (*TLR4 – Toll-like receptor 4*) (MOGENSEN, 2009), desencadeando uma cascata de reações no interior das células que promove a liberação de várias citocinas [por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF-

α), interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-10], que eventualmente são capazes de causar um aumento na produção de Prostaglandina E₂ (PGE₂) (BONE, 1991). As citocinas e a PGE₂ exercem papéis importantes no desenvolvimento da resposta inflamatória, e durante a sepse, a produção desses mediadores encontra-se exacerbada.

1.2.1. Respostas cardiovasculares durante a sepse

A sepse é caracterizada pela produção em excesso de agentes inflamatórios gerando uma série de respostas fisiopatológicas que levam ao comprometimento de múltiplos órgãos e alta taxa de mortalidade.

Do ponto de vista cardiovascular os pacientes sépticos apresentam taquicardia resultante do aumento das concentrações circulantes de catecolaminas (TITHERADGE, 1999). Após essa fase ocorre aumento do débito cardíaco e vasodilatação progressiva com consequente diminuição da resistência vascular periférica. Por fim, está fase é seguida por queda do débito cardíaco ocorrendo marcantes distúrbios na perfusão e oxigenação tecidual (THIEMERMANN, 1997).

Durante o repouso pacientes com sepse apresentam maior demanda metabólica para o consumo de oxigênio (VO₂) quando comparados aos indivíduos saudáveis. Isso ocorre como consequência de um quadro de maior dependência patológica de oxigênio (O₂) (PEREIRA JÚNIOR et al, 1998). No entanto, apesar dessa demanda aumentada por O₂, ocorre menor captação de O₂ pelos tecidos periféricos identificada pela diminuição da diferença arteriovenosa de O₂ e também por importantes alterações causadas na microcirculação tecidual. Esse quadro patológico pode evoluir para hipoxia tecidual e consequentemente para disfunção de múltiplos órgãos (PEREIRA JÚNIOR et al, 1998).

1.2.2. Respostas termorregulatórias durante a sepse

Em humanos, a inflamação sistêmica (IS) associada à sepse é uma resposta complexa com importantes mudanças na temperatura corporal (Tc) manifestada não apenas como febre, mas também como hipotermia (FONSECA et al., 2016). Essas mudanças também são observadas em animais experimentais (ROMANOVSKY et al., 2005). Recentemente, Wiewel

e colaboradores mostraram que a hipotermia, de modo diferente da febre, não pode ser facilmente explicada a partir de uma mudança do estado pró-inflamatório para o estado anti-inflamatório durante a IS severa, mas pode estar associada a disfunções vasculares (WIEWEL et al., 2016). Outra linha de evidências suporta a ideia que a hipotermia pode ser uma resposta adaptativa quando os custos da febre excedem seus benefícios (STEINER et al., 2017). Por exemplo, durante a privação alimentar, quando as reservas energéticas são limitadas, o papel da leptina, na IS, tem sido sugerido baseado nos seus efeitos na hipotermia e na hipotensão. A injeção sistêmica de leptina diminui os níveis plasmáticos de TNF- α e atenua a hipotermia e a hipotensão, indicando que a leptina exerce efeitos anti-inflamatórios (FLATOW et al., 2017). Considerando essas informações, fica claro que os mecanismos e mediadores da hipotermia relacionados a IS permanecem para serem elucidados. Da mesma forma, uma clara relação entre Tc e a taxa de mortalidade da sepse em um grande estudo populacional permanece indisponível.

Por outro lado, está claramente estabelecido que as mudanças na Tc observadas durante a IS são primariamente mediadas por um aumento na produção de PGE₂ agindo na área pré-óptica do hipotálamo (POA), a região hierarquicamente mais importante envolvida com a termorregulação (SAPER et al., 2012).

1.3. Hidrogênio molecular

O hidrogênio molecular (H₂) é a menor molécula de gás conhecida consistindo de dois prótons e dois elétrons. Ele é incolor e inodoro e foi originalmente descrito como inerte em células de mamíferos. Em 1975, pela primeira vez os efeitos terapêuticos do H₂ foram documentados atuando positivamente no tratamento de carcinoma escamoso de camundongos com base na regressão dos tumores da pele desses animais (DOLE et al., 1975).

Em 2015, Ichihara e colaboradores publicaram um elegante estudo descrevendo os diversos efeitos do H₂ em praticamente todos os órgãos em diversas condições incluindo 166 modelos de doenças, doenças humanas, além de doenças mediadas por estresse e doenças inflamatórias (ICHIHARA et al., 2015). Além disso, essas ações foram parcialmente explicadas pela diminuição específica do radical hidroxila e do peroxinitrito bem como pela modulação da atividade e da expressão de diversas moléculas-chave, incluindo os mediadores

da inflamação. Mais recentemente, o H₂ tem sido descrito como sendo capaz de reagir amplamente com diversos substratos ativos nos sistemas biológicos e emergiu como um novo gás terapêutico com aplicações potencialmente amplas baseadas em mecanismos relacionados à modulação do estresse oxidativo, respostas inflamatórias e apoptose, supostamente por meio da ativação da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB) e fator nuclear do tipo 2 (Nrf2)/Heme oxigenasse - 1 (HO-1) (XIE et al., 2014). Por exemplo, o H₂ tem sido sugerido como um agente protetor em diversas condições incluindo lesões causadas por isquemia-reperfusão, acidente vascular encefálico e sepse, uma vez que o gás apresenta uma grande eficácia associada à ausência de efeitos colaterais adversos, fornecendo ainda mais suporte aos promissores efeitos terapêuticos do H₂ (GEORGE e AGARWAL, 2010; OHTA, 2014). De acordo com esse entendimento, camundongos sépticos tratados com H₂ pela via inalatória apresentam menores níveis de mortalidade que parece ser mediada por diminuição do estresse oxidativo e da inflamação em diferentes tecidos (LIU et al., 2014). Entretanto, nenhum estudo anterior avaliou as ações putativas do H₂ nas respostas inflamatórias, termorregulatorias e cardiovasculares durante a IS.

2 – OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inalação de H₂ nos parâmetros vitais usando o modelo experimental mais bem aceito para o estudo da IS. Para atingir esse objetivo nós injetamos duas diferentes doses de LPS (0,1 e 1,5 mg/kg, i.v., para induzir respetivamente, IS moderada ou severa) em ratos e medimos os parâmetros cardiovasculares, Tc, níveis plasmáticos de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e PGE₂ (LEON, 2002), bem como de um mediador anti-inflamatório (IL-10). Além desses marcadores periféricos, também medimos a produção de PGE₂ na POA como indicador final do estado inflamatório (BRANCO et al., 2014).

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neuroquímica da Inflamação Sistêmica do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da

Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP).

3.1. Animais

Nós utilizamos ratos machos *Wistar* com peso corporal entre 250 g e 300 g (tempo de vida entre 7 e 8 semanas) obtidos do Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto. Inicialmente os animais foram mantidos em grupos de até quatro por caixa (comprimento 41 cm x largura 34 cm x altura 16 cm), no Biotério Setorial da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto em condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$), humidade (60 – 65%) e luz (06:00 – 18:00) recebendo alimentação balanceada (NUVLAB CR1 – NUVITAL) para roedores e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais tiveram início entre 07:00 e 09:00 da manhã. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FORP-USP, protocolo nº 15.1.583.22.3.

3.2. Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram adequadamente anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Cetamina 10% (Syntec do Brasil Ltda.) e Cloridrato de Xilazina 2% (Rhbifarma ind. Farmacêutica Ltda.) nas doses 100 e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal (ip). Após a anestesia foi realizada a tricotomia da região dorsal do pescoço, da região abdominal e inguinal do lado esquerdo e limpeza desses locais com solução antisséptica para posterior realização dos procedimentos cirúrgicos. Em seguida inserimos uma cápsula de temperatura *datalogger* (SubCue, Calgary, AB, Canadá) na cavidade peritoneal através de uma laparotomia medial para os registros da Tc. Enquanto o animal permanecia sob o efeito da anestesia ele foi submetido a uma pequena incisão na região inguinal do esquerdo, em direção ao feixe vasculo-nervoso para a introdução de cânulas de polietileno [confeccionadas com tubos de polietileno PE-10 com diâmetro interno de 0,01 mm soldadas a tubos PE-50 com diâmetro interno de 0,05 mm (Intramedic®, Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, EUA)]

na luz da artéria femoral, em direção à aorta abdominal e na luz da veia femoral esquerda. As extremidades de menor calibre, com comprimentos de 5 cm para a artéria, e 3 cm para a veia, eram inseridas completamente na luz dos vasos correspondentes, e fixadas aos mesmos com linha de sutura. Após a introdução das extremidades menores nos vasos, as extremidades PE-50, com comprimento ajustado ao tamanho do animal, eram transpassadas subcutaneamente utilizando-se um trocáter metálico, exteriorizadas no dorso e fixadas na pele com linha de sutura. Posteriormente, no momento do registro, a extremidade exteriorizada da cânula arterial permitia o acesso à pressão arterial pulsátil (PAP) e consequentemente o acesso à pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) e a extremidade da cânula venosa a administração de LPS ou salina. Antes do implante, as cânulas eram preenchidas com salina livre de pirógenos 0,9% heparinizada (50 u/ml) e fechadas em sua extremidade mais calibrosa com pinos de aço inoxidável para não ocorrer extravasamento de sangue até o momento do registro. Após os procedimentos cirúrgicos, os ratos recuperavam por 24 horas em um ambiente com a temperatura controlada em 22° C antes do início do protocolo experimental, que foi realizado com livre movimentação dos animais sem anestesia. Esse período de recuperação foi escolhido baseado em experimentos piloto, onde nós observamos que 24 horas levaram aos resultados mais consistentes e reproduzíveis e também baseado em outros estudos prévios (BUTTLER et al., 2017; KATAYAMA et al., 2015; SABINO et al., 2016).

3.3. Medidas da Tc, PAM e FC

Antes da realização dos procedimentos cirúrgicos as cápsulas de temperatura *datalogger* foram programadas em relação ao horário local, tempo de início do registro e taxa de amostragem usando o *software* SubCue (SubCue, Calgary, AB, Canada). Os dados de temperatura registrados foram corrigidos usando uma tabela de correção específica para cada *datalogger* fornecida pelo fabricante. Tc (especificamente, temperatura abdominal) foi registrada em intervalos de 5 minutos usando o *datalogger*. No momento do experimento, em animais não anestesiados e com livre movimentação, o cateter arterial exteriorizado foi conectado ao transdutor de pressão (MLT 0699, ADInstruments, Bella Vista, Australia) que foi conectado a um amplificador (Bridge Amp, FE2211861, ADInstruments). O sistema de registro (Powerlab 8/35, PL35080562, ADInstruments) foi usado para a aquisição do sinal

referente à PAP com uma taxa de amostragem de 1 kHz e esses dados foram registrados usando o *software* correspondente (Lab Chart Pro v. 7.3.1, Ad Instruments). PAM e FC foram determinadas por meio do sinal da PAP (SABINO et al., 2016).

3.4. Coleta de amostras do plasma

Os ratos foram decapitados e as amostras do sangue truncal foram coletadas em tubos de ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) que em seguida foram centrifugados (3500 rpm por 20 minutos a 4º C). As amostras do plasma foram coletadas 120 minutos após a administração do LPS, pois esse período de tempo coincide com a resposta febril observada [Figura (Fig.) 3] e após 360 minutos no final do período destinado ao protocolo experimental. As amostras foram alicotadas e posteriormente armazenadas no freezer -80º C até o momento da análise (citcinas e PGE₂).

3.5. Coleta de amostras da POA

Após a decapitação dos animais, os cérebros foram rapidamente removidos e imediatamente congelados por imersão em isopentano resfriado por gelo seco e armazena a -80º C até o momento da coleta da amostra. Amostras bilaterais da POA foram obtidas com um pino de punção cilíndrico (0,9 mm de diâmetro interno) em um criostato com três cortes individuais de 500 µm da POA com base nos seguintes pontos de referência: ventral, quiasma óptico; dorsal, comissura anterior; medial, terceiro ventrículo.

As punções foram realizadas imediatamente acima do limite dorsal do quiasma óptico e na parede esquerda e direita do terceiro ventrículo. Os cérebros foram cortados de sua extremidade caudal com a finalidade de alcançar o plano da comissura anterior, cuja porção mais caudal corresponde ao plano mais caudal da POA (PAXINOS e WATSON, 1998).

3.6. Medida dos níveis plasmáticos de citocinas e PGE₂

Os níveis plasmáticos de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, e PGE₂ foram mensurados em 120 minutos e 360 minutos depois das injeções de salina ou LPS. A dosagem de cada citocina

e da PGE₂ foi realizada por meio de KIT de ELISA (TNF- α #DY510, IL-1 β #DY501, IL-6 #DY506, IL-10 #DY522, e PGE₂ #514010, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as orientações do fabricante. Os KITS de ELISA utilizados eram específicos para ratos.

3.7. Medida da PGE₂ da POA

As amostras da POA foram individualmente homogeneizadas por ultrassom com um tampão fornecido pelo fabricante e centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado e submetido à análise por meio do KIT de ELISA para PGE₂ (#514010, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as orientações do fabricante.

3.8. Procedimentos experimentais

IS foi induzida pela administração intravenosa (iv) de LPS de *Escherichia coli* (0111:B4, Sigma-aldrich, USA). O LPS foi diluído para uma concentração final de 0,1 ou 1,5 mg/ml em solução salina livre de pirógenos. Essa solução foi injetada em bolus (1 ml/kg, iv). As doses de LPS administradas eram baixas o suficiente para causar apenas febre (STEINER et al., 2004) usando 0,1 mg/kg ou altas o bastante para causar hipotermia seguida de febre acompanhada por mudanças cardiovasculares (GIUSTIPAIVA et al., 2002) usando 1,5 mg/kg.

Os animais foram individualmente colocados em caixas acrílicas seladas com entrada e saída de ar. A mistura gasosa contendo H₂ (2%), O₂ (21%) e Nitrogênio (N₂) (77%) foi fornecida do cilindro de gás, passando por um fluxômetro (Cole-Parmer Instrument Company, IL, USA), até chegar ao interior da caixa acrílica por um tubo em um fluxo controlado de 2 litros por minuto durante 360 minutos (6 horas). Os animais dos grupos controle foram expostos ao ar ambiente na mesma caixa acrílica com o mesmo fluxo de ar de 2 litros por minuto. A temperatura ambiente foi mantida a 22° C.

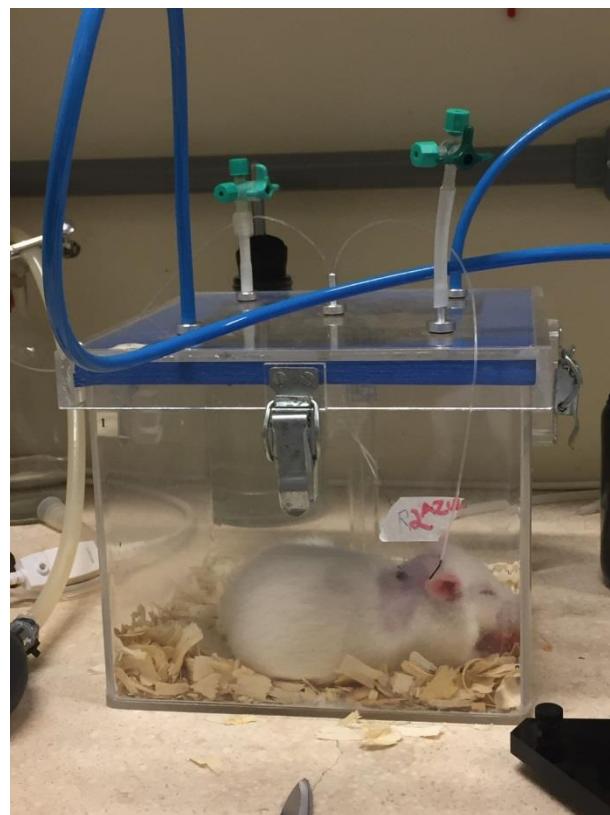


Figura 1. Visão frontal da caixa acrílica selada com o animal em seu interior. É possível observar na parte superior da caixa os locais para entrada e saída de ar bem como as cânulas arterial e venosa.

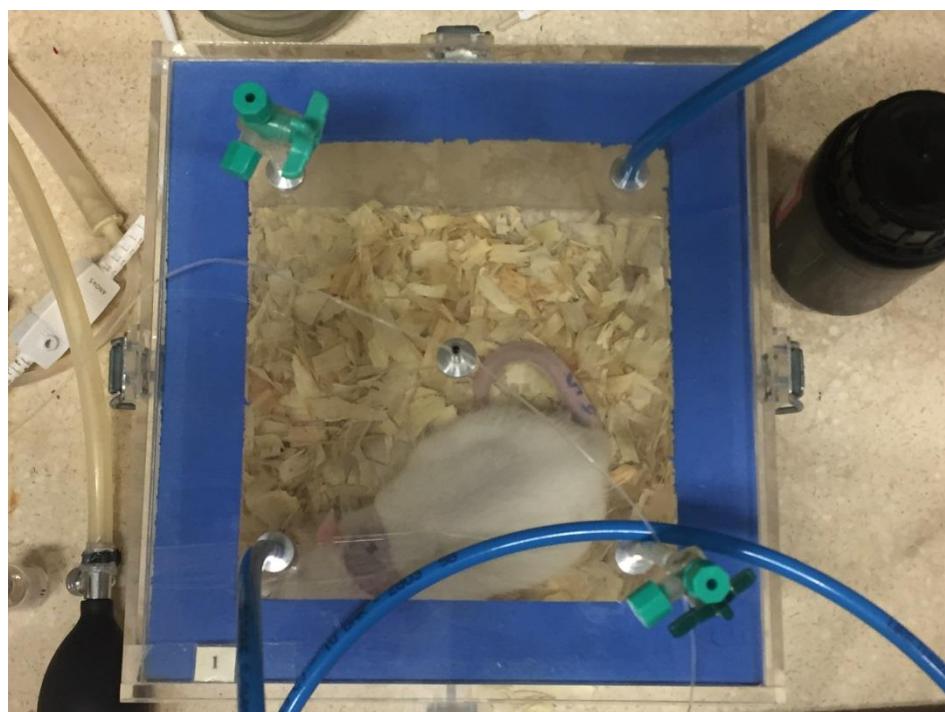


Figura 2. Visão superior da caixa acrílica selada com o animal em seu interior. É possível observar na parte superior da caixa os locais para entrada e saída de ar bem como as cânulas arterial e venosa.

3.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão da média (EPM). Nós plotamos os dados do registro do curso temporal da Tc como diferenças (delta) dos valores da temperatura basal inicial (Tbi). Os valores basais [Figuras (Figs.) 3 e 7] foram calculados com base na média dos últimos 30 minutos antes da injeção e definidos como 0 quando plotadas, então as mudanças (delta) de Tc foram calculadas e plotadas. O índice térmico (IT) é um método bem estabelecido de enfatizar e analisar a amplitude das respostas térmicas, e foi calculado a partir da área sob a curva (ASC) (EMÍLIO-SILVA et al., 2017; MOTA et al., 2017; SORIANO et al., 2018). Nós estabelecemos 0 como linha de base e calculamos a ASC das mudanças de Tc para enfatizar e analisar a amplitude da resposta febril de 300 a 360 minutos (mostrados como IT e plotados como gráfico de barras; Figs. 3 e 7, painel da direita). Quando a maior dose de LPS foi administrada (1,5 mg/kg) para enfatizar a análise da fase de hipotermia (negativa) de 30 a 90 minutos nós determinamos 0 como linha de base e nesse caso calculamos a sobre a curva sobre a curva (mostrado como IT e plotado como gráfico de barras; Fig. 7, painel da esquerda). As áreas sob/sobre a curva são expressas em graus Celsius (eixo y) e minutos (eixo x). As análises estatísticas das áreas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional (*one-way*) seguido pelo pós-teste de Tukey. PAM e FC foram analisadas pela ANOVA bidirecional (*two-way*) seguido pelo pós-teste de Tukey. Os valores plasmáticos de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, e PGE₂ bem como a PGE₂ da POA foram realizadas por meio de ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 – RESULTADOS

4.1. Influência do H₂ na regulação da Tc durante a IS moderada

O perfil das alterações termorregulatórias observadas nos grupos estudados quando o LPS foi administrado na dose de 0,1 mg/kg está representado no painel à esquerda da Figura 3. A análise da ASC, exposta no painel à direita da referida figura é expressa como IT. Podemos observar que o H₂ por si só não provoca alterações termorregulatórias, pois os animais tratados com salina que inalaram a mistura contendo H₂ não apresentaram diferença

na Tc quando comparados aos animais tratados com salina que inalaram ar ambiente. Como esperado, os animais do grupo LPS + ar desenvolveram febre, iniciando essa resposta a partir dos 90 minutos da administração de endotoxina. No entanto, os animais que foram tratados com H₂, a partir do momento da administração de LPS, apresentaram significativa atenuação desta resposta (Fig. 3).

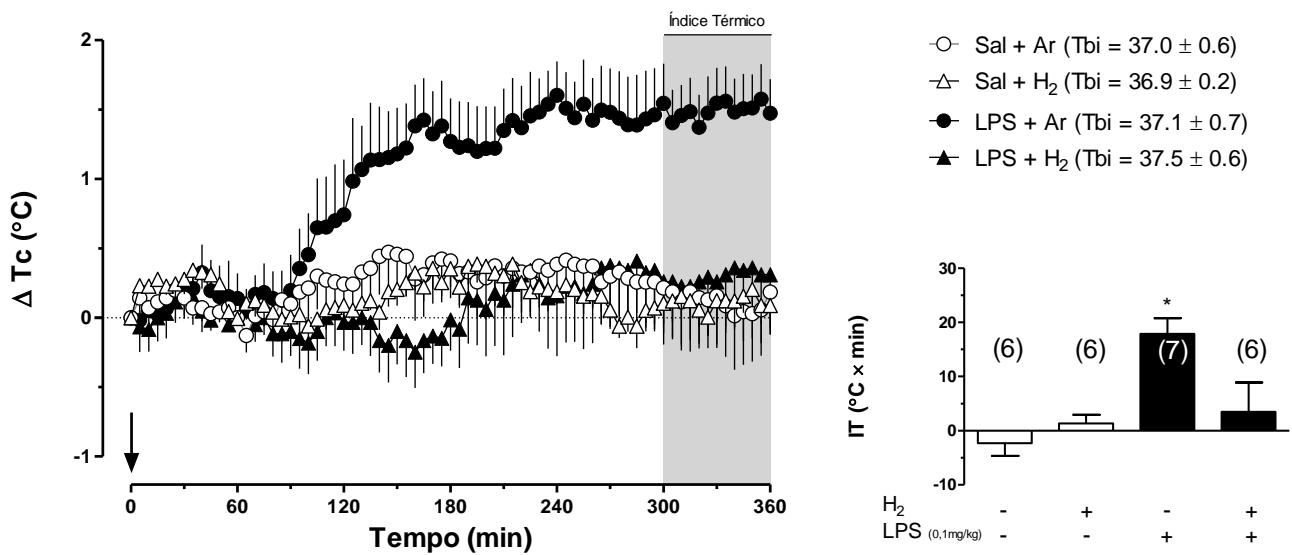


Figura 3. Painel à esquerda. Evolução temporal da variação de Tc de ratos tratados com salina e ar ambiente (círculos brancos) ou mistura gasosa contendo H₂ (Triângulos brancos) e ratos tratados com LPS (0,1mg/kg) e ar ambiente (círculos pretos) ou mistura gasosa contendo H₂ (Triângulos pretos). Painel à direita: área sob a curva de Tc avaliada entre os minutos 300-360. As diferenças entre os grupos foram verificadas por ANOVA *one-way*, seguido pelo pós-teste de Tukey. * p < 0,05; comparado aos demais grupos.

4.2. Análise dos mediadores inflamatórios plasmáticos e os efeitos do H₂ durante a IS moderada

Por meio da dosagem de citocinas plasmáticas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e PGE₂, pudemos analisar a magnitude da resposta inflamatória ao LPS (0,1 mg/kg). Ao observarmos a Figura 4, identificamos aumento na concentração plasmática de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e PGE₂ nos animais do grupo LPS + ar (Fig. 4). No grupo cuja administração de LPS foi seguida da inalação de H₂, os aumentos dos níveis plasmáticos de TNF- α aos 120 min (Fig. 2A), e de IL-6 aos 360 min (Fig. 4F) induzidos por LPS foram significativamente atenuados. Além disso, a inalação da mistura contendo esse gás aumentou de modo significativo os

níveis de IL-10 observados aos 120 e 360 minutos do início do tratamento concomitante com a administração de LPS (Fig. 4G, H). As concentrações de TNF- α aos 360 min (Fig. 4B), IL-1 β em ambos os tempos (Fig. 4C, D), IL-6 aos 120 min (Fig. 4E) e PGE₂ em ambos os tempos (Fig. 4I, J) não foram diferentes entre os grupos tratados com LPS respirando as diferentes composições gasosas.

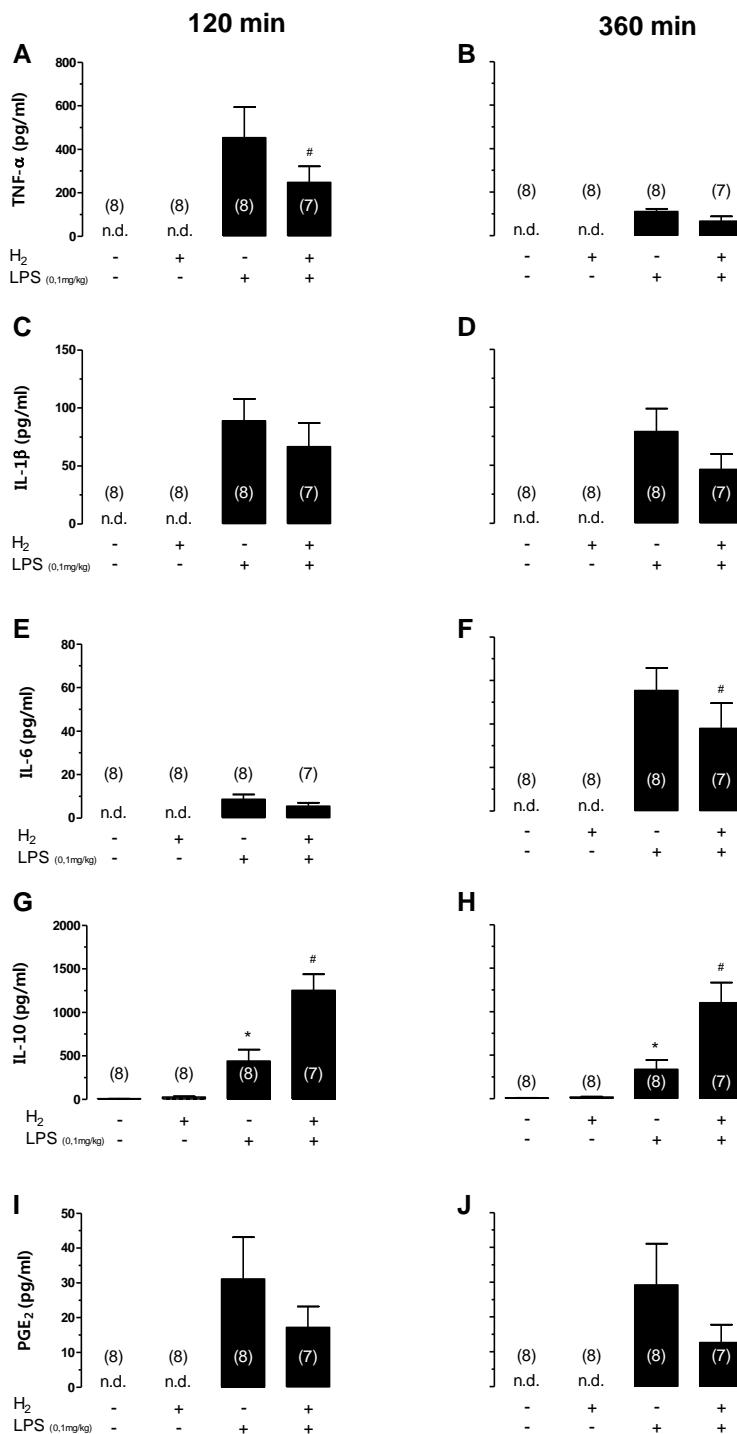


Figura 4. Concentrações de citocinas e PGE₂ plasmáticas. Apresentam-se as médias ± EPM das concentrações plasmáticas de TNF- α (A, B); IL-1 β (C, D); IL-6 (E, F); IL-10 (G, H), e PGE₂ (I, J) dos animais tratados com salina ou LPS (0,1 mg/kg) que inalaram a mistura gasosa contendo H₂ ou ar ambiente, avaliadas aos 120 min (painéis à esquerda) e 360 min (painéis à direita) após o tratamento. As diferenças entre os grupos foram verificadas por ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Tukey. * p < 0,05; em relação aos grupos tratados com salina (IL-10). # p < 0,05; em relação ao grupo LPS + ar. N.d. Níveis não detectados.

4.3. Análise da PGE₂ na POA durante a IS moderada

Na POA o LPS promoveu aumento na produção de PGE₂, como demonstrado nos resultados do grupo LPS + ar (0,1 mg/kg). Esse aumento não foi observado nos grupos que receberam o tratamento com inalação de H₂. Estes resultados estão expressos como média ± EPM na Figura 5.

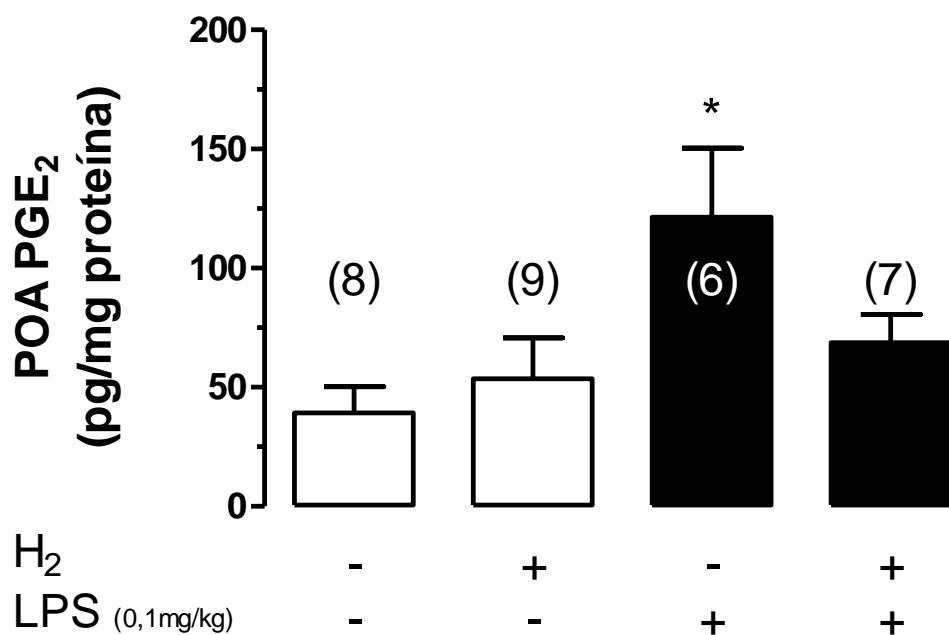


Figura 5. Concentrações de PGE₂ na POA. Apresentam-se as médias ± EPM das concentrações de PGE₂ na POA dos animais tratados com salina ou LPS (0,1 mg/kg), que inalaram mistura gasosa contendo H₂ ou ar ambiente, avaliadas aos 360 min após o tratamento. As diferenças entre os grupos foram verificadas por ANOVA *one-way*, seguido pelo pós-teste de Tukey. * p < 0,05; em relação aos grupos tratados com salina.

4.4. Influência do H₂ na PAM e FC durante a IS severa

Na Figura 6 estão expressas as médias dos valores de PAM e FC dos animais tratados com dose alta de LPS (1,5 mg/kg) que inalaram mistura gasosa contendo H₂ e ar ambiente, bem como dos animais que receberam Salina 0,9% e foram submetidos às duas misturas gasosas. Como podemos observar, o LPS induziu queda na PAM após 40 min de sua administração. De modo interessante, essa resposta foi significativamente atenuada no grupo que inalou o H₂ (Fig. 6, painel superior).

O perfil temporal da FC (Fig. 6, painel inferior) demonstra que esta variável não foi diferente entre os grupos tratados com H₂ e ar ambiente, sendo que ambos apresentaram aumento acentuado nesse parâmetro a partir de 10 minutos após a administração de LPS, quando comparado aos grupos que receberam administração de salina.

O tratamento com H₂ por si só não provocou alterações tanto na PAM quanto na FC em relação ao grupo que inalou ar ambiente, quando comparados os grupos cuja salina foi administrada.

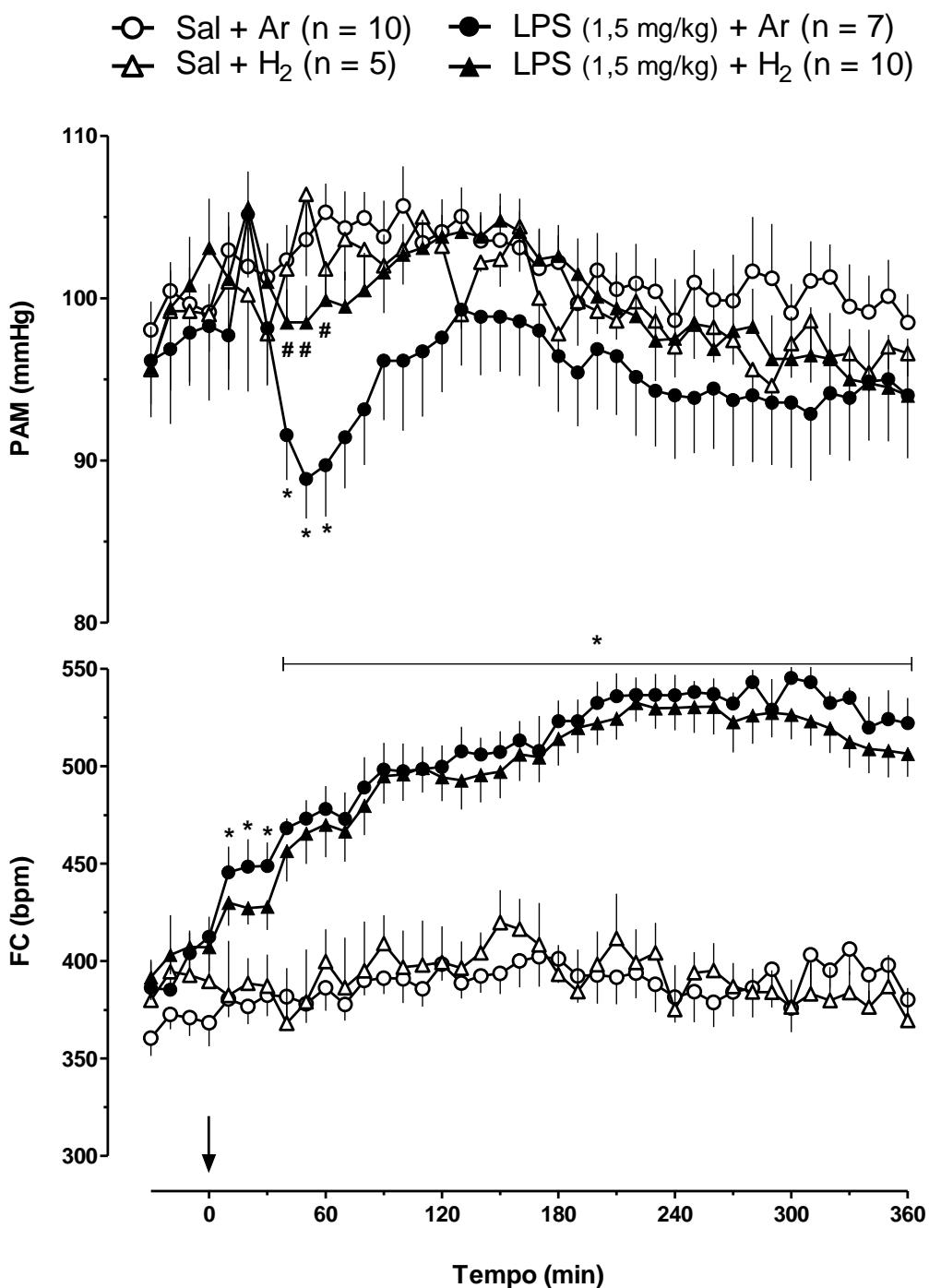


Figura 6. Evolução temporal da PAM e FC de ratos controle tratados com salina (círculos brancos) ou tratados com LPS (círculos pretos) e ratos que respiraram a mistura gasosa contendo H₂ (Triângulos brancos) ou ar ambiente (Triângulos pretos). Apresentam-se as médias \pm EPM dos valores PAM (painel superior) e FC (painel inferior) em relação ao tempo avaliadas por ANOVA two-way, seguido pelo pós-teste de Tukey. As setas indicam o momento da injeção i.v. de LPS ou salina, imediatamente seguida da inalação de mistura gasosa contendo H₂ ou ar ambiente. * p < 0,05, em comparação aos grupos salina. # p < 0,05, em comparação com o grupo LPS + ar ambiente.

4.5. Influência do H₂ na regulação da Tc durante a IS severa

A figura 7 apresenta o perfil temporal das alterações termorregulatórias observadas quando o protocolo experimental envolveu os grupos com administração de alta dose de LPS (1,5 mg/kg), bem como seus controles com administração de salina e o tratamento ou não com a mistura gasosa contendo H₂ (Fig. 7, painel superior). Também são apresentadas as análises da ASC da Tc em diferentes momentos (Fig. 7, painéis inferiores). Podemos observar que, num primeiro momento, a Tc sofre uma queda após a administração de LPS. Essa queda é potencializada pela ação do H₂ (Fig. 7, Painel inferior à esquerda). Em seguida, a Tc aumenta, a partir dos 90 min da administração de LPS. Os animais que receberam o tratamento com H₂ apresentam o mesmo perfil, porém o aumento na temperatura neste grupo se iguala aos valores dos grupos salina. Podemos observar, com o cálculo do IT dos 300 aos 360 minutos, que o aumento da Tc observado no grupo LPS + ar ambiente foi prevenido no grupo que recebeu H₂ (Fig. 7, painel inferior à direita).

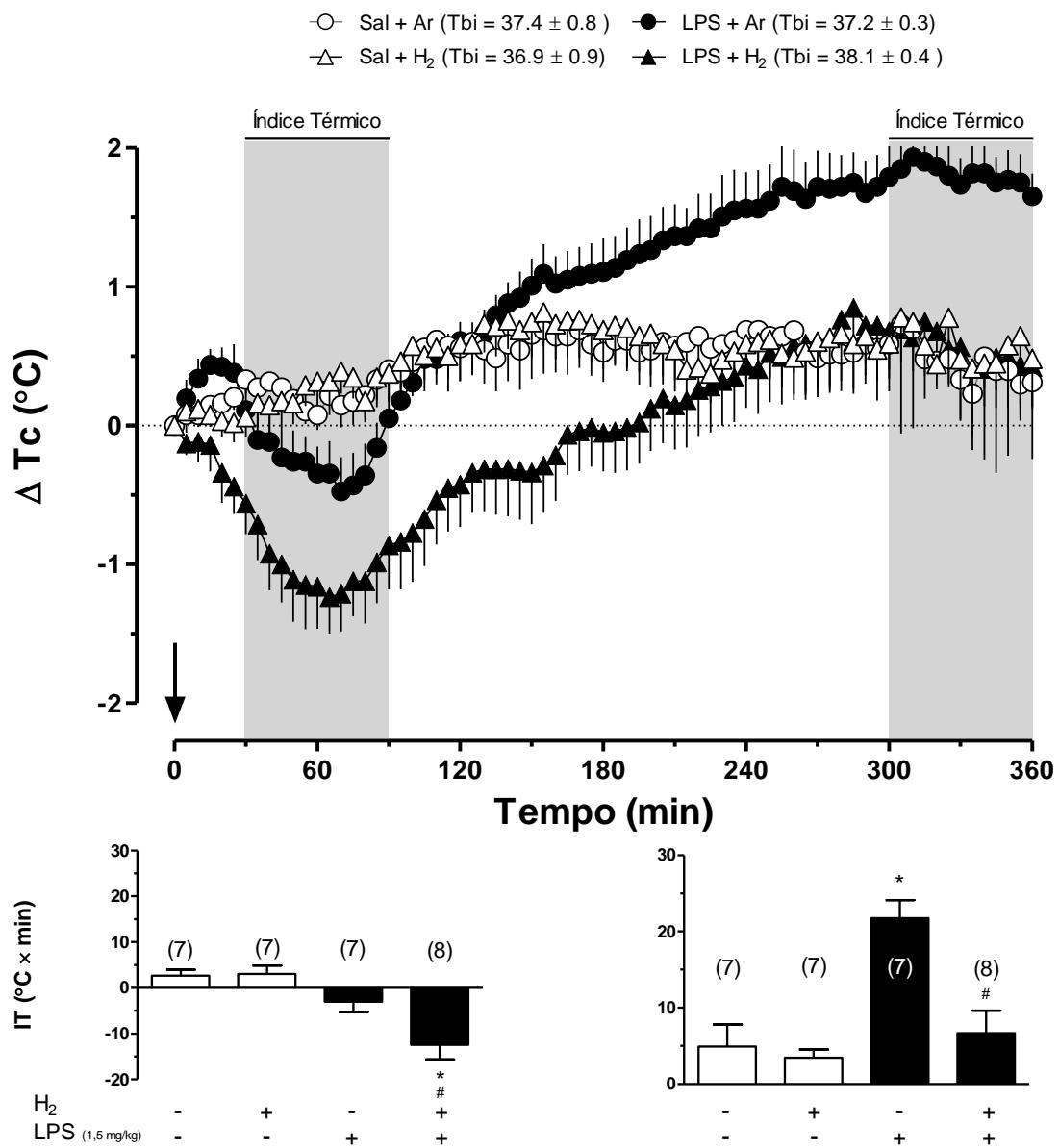


Figura 7. Painel superior. Evolução temporal da variação de T_c de ratos tratados com salina e ar ambiente (círculos brancos) ou mistura gasosa contendo H_2 (Triângulos brancos) e ratos tratados com LPS (1,5 mg/kg) e ar ambiente (círculos pretos) ou mistura gasosa contendo H_2 (Triângulos pretos). Painel inferior à esquerda: área sob a curva de T_c avaliada entre os minutos 30 e 90 após o início dos respectivos tratamentos. Painel inferior à direita: área sob a curva de T_c avaliada entre os minutos 300 e 360 após o início dos respectivos tratamentos. As diferenças entre os grupos foram verificadas por ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; em comparação com os grupos salina. # $p < 0,05$, em comparação com o grupo LPS + ar ambiente.

4.6. Análise dos mediadores inflamatórios plasmáticos e os efeitos do H₂ durante a IS severa

Avaliamos as concentrações de citocinas plasmáticas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e PGE₂ no modelo de inflamação severa induzida por alta dose de LPS (1,5 mg/kg).

A análise da Figura 8 nos permite identificar o aumento nas concentrações plasmáticas de todas as citocinas estudadas após a administração de LPS em diferentes momentos (120 min, painéis à esquerda e 360 min, painéis à direita). Além disso, a injeção de LPS também provocou aumento na concentração plasmática de PGE₂. No grupo cuja administração de LPS foi seguida da inalação de H₂, os aumentos nas concentrações de TNF- α aos 120 min (Fig. 8A), de IL-1 β aos 120 e 360 min (Fig. 8C, D), e PGE₂ também em ambos os tempos (Fig. 8I, J) foram significativamente reduzidos. Além disso, assim como ocorreu com os grupos cuja administração de LPS foi em dose baixa (Fig. 4G, H), o tratamento com H₂ potencializou o aumento na concentração de IL-10 induzido por LPS em alta dose, aos 120 e 360 min (Fig. 8G, H).

As concentrações de TNF- α aos 360 min (Fig. 8B) e IL-6 aos 120 e 360 min (Fig. 8E, F), não foram diferentes entre os grupos tratados com LPS respirando as diferentes composições gasosas.

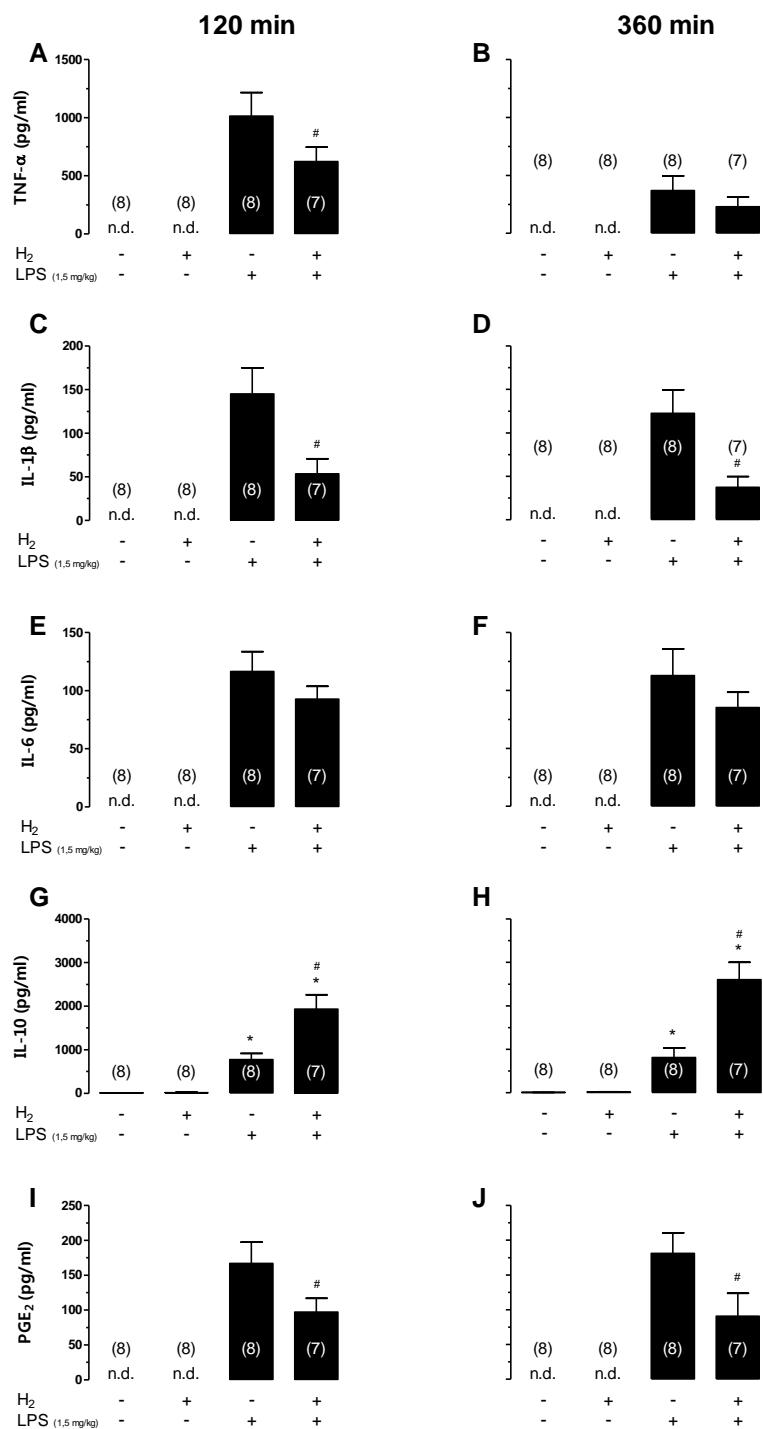


Figura 8. Concentrações de citocinas e PGE₂ plasmáticas. Apresentam-se as médias \pm EPM das concentrações plasmáticas de TNF- α (A, B); IL-1 β (C, D); IL-6 (E, F); IL-10 (G, H), e PGE₂ (I, J) dos animais tratados com salina ou LPS (1,5 mg/kg) que inalaram a mistura gasosa contendo H₂ ou ar ambiente, avaliadas aos 120 min (painéis à esquerda) e 360 min (painéis à direita) após o tratamento. As diferenças entre os grupos foram verificadas por ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Tukey. * p < 0,05; em relação aos grupos tratados com salina (IL-10). # p < 0,05; em relação ao grupo LPS + ar. N.d. Níveis não detectados.

4.7. Análise da PGE₂ na POA durante a IS severa

Na POA, assim como observado quando os animais receberam dose baixa de LPS (0,1 mg/kg), o LPS em dose alta (1,5 mg/kg) provocou aumento na concentração de PGE₂, porém, em maior magnitude. O grande aumento na concentração dessa prostaglandina foi significativamente reduzido quando os animais, recebendo a mesma dose de LPS, foram tratados com H₂ (Fig. 9).

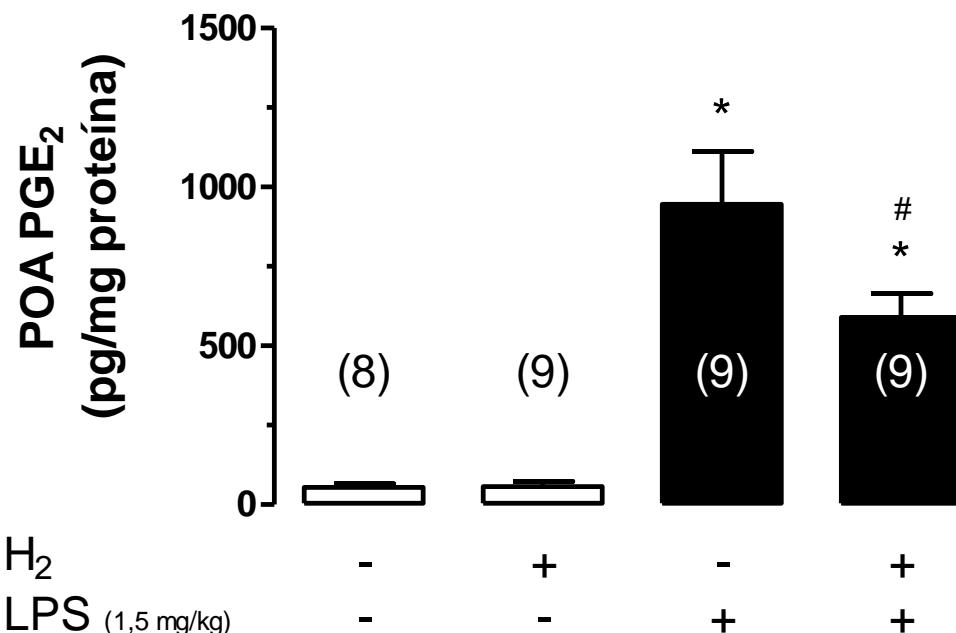


Figura 9. Concentrações de PGE₂ na POA. Apresentam-se as médias ± EPM das concentrações de PGE₂ na POA dos animais tratados com salina ou LPS (1,5 mg/kg), que inalaram mistura gasosa contendo H₂ ou ar ambiente, avaliadas aos 360 min após o tratamento. As diferenças entre os grupos foram verificadas por ANOVA *one-way*, seguido pelo pós-teste de Tukey. * p < 0,05; em relação aos grupos tratados com salina; # p < 0,05; em relação ao grupo LPS + ar ambiente.

5 – DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a documentar que o H₂ foi capaz de prevenir a hipotensão induzida por LPS (Fig. 6). Além disso, esse gás atenuou a liberação de mediadores plasmáticos pró-inflamatórios e concomitantemente estimulou a liberação de um mediador anti-inflamatório (Figs. 4 e 8). Por si só, o gás não foi capaz de exercer efeito nos valores basais de PAM, FC e Tc e não alterou a produção de mediadores inflamatórios no plasma e na

POA. Por outro lado, o H₂ potencializou a hipotermia induzida por LPS e preveniu a febre induzida por LPS.

Existem evidências que o óxido nítrico (NO) exerce um papel imunorregulatório durante a IS, dependente da quantidade de NO produzido. Uma pequena quantidade de NO pode aumentar a produção de mediadores pró-inflamatórios, possivelmente através da ativação do NF-κB, enquanto uma maior quantidade de NO pode suprimi-las possivelmente pela inibição do NF-κB (KOBAYASHI, 2010).

Em um estudo realizado em nosso laboratório (SARAMAGO et al., *in press*) foram investigados os mecanismos pelos quais o H₂ apresenta efeitos tão importantes durante a IS avaliando também as concentrações plasmáticas de NO durante a IS associada à inalação de H₂. Saramago e colaboradores relataram que o NO pode exercer um efeito inibitório na produção de citocinas plasmáticas, principalmente quando uma maior dose de LPS é administrada. As citocinas que nós avaliamos nesse estudo possuem diferentes papéis durante a IS. TNF-α, IL-1β e IL-6 parecem ser mediadores pró-inflamatórios, enquanto a IL-10 parece ser um agente anti-inflamatório (SCHULTE et al., 2013).

Alterações típicas foram observadas em ratos tratados com LPS que respiraram ar ambiente, isto é, febre induzida por LPS quando se utiliza uma dose baixa (BRANCO et al., 2014) e queda da PAM induzida por LPS concomitantemente associada à hipotermia seguida de febre quando se utiliza a dose alta, como anteriormente descrito (GIUSTI-PAIVA et al., 2002). IS severa é caracterizada por hipotensão associada à taquicardia. Durante a fase inicial da IS associada à sepse, a ativação simpática pode ser suficiente para manter a pressão arterial em valores próximos da normalidade. O aumento do tônus simpático, entre outros efeitos, promove uma redistribuição do volume sanguíneo com diminuição do fluxo sanguíneo para órgãos não vitais (Isto é, pele e músculo), e vasoconstrição sistêmica, aumentando o retorno venoso. O aumento do retorno venoso associado com o aumento da FC e da resistência periférica pode prevenir o choque circulatório. Entretanto, quando esses mecanismos adaptativos são insuficientes à hipotensão prevalece (DELLAVOLPE et al., 2015).

No presente estudo observamos que a administração endovenosa de LPS causou uma queda na PAM (Fig. 6), associada a um aumento da FC (Fig. 6). A hipotensão durante a IS é

multifatorial e induz uma série de alterações metabólicas e fisiológicas, como diminuição da sensibilidade adrenérgica das células do músculo liso arterial, perda da função regulatória das células endoteliais adjacentes ao músculo liso arterial e aumento da produção de NO pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (MIRANDA et al., 2016; SHARAWY, 2014). Esta isoforma da iNOS pode ser expressa por qualquer célula do corpo sob estímulos adequados, incluindo citocinas e LPS (SALVEMINI et al., 1990; STUEHR et al., 1991). O NO é um importante modulador das células musculares lisas arteriolares (vasos de resistência), capaz de ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) aumentando os níveis intracelulares de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), o mediador do relaxamento das células musculares lisas arteriais (BRANCO et al. 2014). De fato, a produção de NO durante a IS associada à sepse em humanos está intimamente relacionada com distúrbios hemodinâmicos (GÓMEZ-JIMÉNEZ et al., 1995; MIRANDA et al., 2016). De acordo com esse entendimento, a hipotensão induzida por LPS é bastante atenuada em camundongos nocaute para iNOS (CARNIO et al., 2005). Um estudo realizado em nosso laboratório (SARAMAGO et al., in press) reforçou o fato que o NO é um dos principais mediadores responsáveis pela queda da pressão arterial durante a hipotensão induzida por LPS, uma vez que a concentração de nitrato, um produto da degradação do NO, se mostrou aumentado durante a IS severa. A produção de NO é parcialmente mediada por citocinas (Kobayashi, 2010) e, portanto, a produção de NO plasmático causada pelo H₂ pode ser resultado da diminuição dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (SARAMAGO et al., in press).

Em relação à FC, observamos taquicardia persistente após a administração de LPS (Fig. 6) que pode ser explicada pelo aumento da atividade simpática (DELLAVOLPE et al., 2015) mediada pelo barorreflexo (ROBERTS, 2016). As citocinas estimulam a produção de PGE₂ da POA (SAPER et al., 2012). Em 1971, Milton e Wendlandt foram os primeiros a documentar que a administração intracerebral de PGE₂ provoca uma resposta febril imediata (MILTON e WENDLANDT, 1971). Atualmente a PGE₂ é conhecida como uma molécula chave envolvida nas respostas fisiopatológicas mediadas pelo sistema nervoso central durante a IS (SAPER et al., 2012). No presente estudo o aumento das concentrações de TNF α , IL-1 β , e IL-6 foram reduzidos pelo H₂, enquanto o aumento da IL-10 induzido pelo LPS foi potencializado pelo H₂. Os presentes resultados corroboram com estudos prévios que demonstraram redução plasmática das citocinas pró-inflamatórias de ratos injetados com LPS

em diferentes abordagens (XIE et al., 2012, 2010a, b; ZHANG et al., 2011). Além disso, a ingestão crônica de água enriquecida com H₂ melhora as consequências da neuroinflamação induzida por LPS, que parece estar relacionada com uma regulação negativa do TNF- α e uma regulação positiva da IL-10 (SPULBER et al., 2012). A IL-10 é essencial para reduzir respostas imunes e prevenir imunopatologias (COMI et al., 2018). Por exemplo, o aumento da resposta inflamatória ao desafio imune induzido por bactéria levando ao desenvolvimento de doença inflamatória intestinal tem sido relatado quando a IL-10 é deficiente (GLOCKER et al., 2009). A IL-10 administrada em cultura de células microgliais de camundongos estimuladas por LPS é capaz de reduzir a produção de TNF α , IL-1 β , e IL-6 (SAWADA et al., 1999). Finalmente, é interessante notar que a IL-10 também pode inibir a produção de NO por macrófagos estimulados por LPS (CUNHA et al., 1992). Portanto, está claro que existem interações muito complexas entre as citocinas entre si e entre as citocinas e o NO, e todos juntos eventualmente determinam as alterações nos parâmetros cardiovasculares (Fig. 6) e termorregulatórias (Fig. 7) que nós avaliamos durante a IS severa.

De modo interessante, foi reportado que o fator de transcrição NF- κ B controla a expressão de vários genes incluindo aqueles envolvidos na modulação da inflamação (HOESEL e SCHMID, 2013). Os receptores pró-inflamatórios incluindo o receptor de TNF α , a família dos receptores do tipo *Toll-like*, e os receptores de interleucinas são capazes de ativar a via do NF- κ B (MORGAN e LIU, 2011). Nesse sentido, é bem conhecido que o NF- κ B regula a expressão genica das citocinas (XIE et al., 2014). Considerando as informações disponíveis, fica claro que o NF- κ B exerce um papel chave na regulação da resposta inflamatória ao LPS. De maneira interessante um estudo recente relatou que a inalação de H₂ reduz a resposta inflamatória induzida pelo TNF α nas células endoteliais por inibir a ativação do NF- κ B (SONG et al., 2011).

Além dessas evidencias indicando que o H₂ atenua os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias durante a inflamação sistêmica tem sido relatado que esse gás provoca maiores aumentos dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (CHEN et al., 2013) e que também foi encontrado neste estudo. Em conclusão, moléculas da via de sinalização do NF- κ B exercem papéis centrais na IS e o H₂ é capaz de modular essas moléculas. Um possível mecanismo pelo qual o H₂ exerce esse efeito modulatório tem sido proposto por Iuchi e

colaboradores (2016) baseado no fato que quando a cadeia de oxidação dos radicais livres gera mediadores lipídicos oxidados a sinalização do cálcio é ativada. Na presença de H₂ a produção de fosfolipídeos oxidados poderia estar alterada devido a uma modulação das cadeias de radicais livres. Os fosfolipídeos oxidados poderiam levar a uma sinalização do cálcio reduzida, eventualmente causando uma inibição da expressão de TNFα e Cicloxygenase II (COXII).

Nós especulamos que os efeitos de limpeza do H₂ sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) podem ter contribuído para os resultados do nosso estudo. Tem sido demonstrado que o H₂ neutraliza os radicais hidroxila e peroxinitrito, protegendo as células contra o estresse oxidativo e agindo como uma molécula anti-apoptótica e antioxidante (ISHIBASHI, 2013; OHTA, 2014).

Para investigar o quanto o H₂ altera a resposta termorregulatória em uma forma severa de inflamação sistêmica induzida por LPS nós administraramos a dose alta de LPS aos ratos. A dose alta de LPS (1,5 mg/kg) causa a hipotermia típica seguida de febre em animais expostos a uma temperatura ambiente subtermoneutra (22° C) (STEINER e ROMANOVSKY, 2007; SZÉKELY e ROMANOVSKY, 1998). De modo interessante, a resposta hipotérmica a alta dose de LPS foi aumentada pelo H₂. Parece plausível especular que o H₂ de alguma forma potencializa a resposta hipotérmica ao LPS principalmente por aumentar a sinalização inflamatória criogênica, que pode envolver PGD₂ e uma responsividade hipotalâmica a ela (KLUGER, 1991; OIDA et al., 1997). De maneira similar o efeito do H₂ na febre induzida pela baixa dose de LPS (Fig. 3), o gás também preveniu a febre durante a IS severa. Nós especulamos que essas respostas febris evocadas pela dose baixa e alta de LPS (Fig. 3 e 7) e drasticamente atenuadas pelo H₂ foram causadas por uma redução dos níveis de citocinas (Fig. 4 e 8) e pelos níveis reduzidos de PGE₂ na POA (Fig. 5 e 9) observados quando os animais tratados com LPS inalaram H₂.

Pode se especular que a queda na PAM e a hipotermia em modelos de IS estão fortemente associadas, uma vez que elas podem ser disparadas pelas mesmas populações celulares nos órgãos periféricos e acontecerem simultaneamente (AL-SAFFAR et al., 2013). Essas suposições não são suportadas pelos resultados encontrados no nosso estudo, uma vez que o H₂ aboliu a queda da pressão arterial enquanto potencializou a hipotermia induzidas por

LPS. De acordo com Al-Saffar e colaboradores (2013) a hipotermia e a hipotensão são disparadas exclusivamente pelo LPS agindo fora do cérebro e as diferenças de mecanismos entre elas durante a IS residem nas vias neuronais que regulam cada resposta, isto é, uma lesão na POA reduz a hipotensão induzida por LPS (YILMAZ et al., 2008), enquanto a lesão do hipotálamo dorsomedial afeta a hipotermia induzida por LPS e seu comportamento associado (ALMEIDA et al., 2006a, b). Além disso, enquanto a hipotermia é atribuída à área do cérebro responsável pela regulação da troca de calor e do comportamento (ROMANOVSKY et al., 2005), o papel do cérebro na hipotensão pode ser relativamente menor (LANDRY e OLIVER, 2001). Considerando estes resultados, nós especulamos que o efeito do H₂ de potencializar a hipotermia induzida por LPS pode ser resultante do efeito desse gás no cérebro, enquanto que o efeito do H₂ responsável por atenuar a hipotensão induzida pelo LPS pode ser resultante do seu efeito local nos vasos sanguíneos.

Comparado a febre ainda se sabe pouco sobre os mecanismos responsáveis pela hipotermia, embora a hipotermia associada a IS tem sido considerada importante e com significado clínico relevante (CLEMMER et al., 1992). Há duas décadas, a hipotermia era considerada uma falha no sistema de termorregulação do organismo durante a IS severa. Por outro lado, na última década, este conceito foi reavaliado em estudos que mostram a existência de mecanismos termorregulatórios envolvidos no controle da hipotermia (STEINER et al., 2017). No presente estudo, observamos que a inalação de H₂ aumentou a hipotermia (Fig. 7). Baseado no entendimento que a hipotermia representa uma resposta adaptativa quando os custos da febre excedem seus benéficos (STEINER et al., 2017), especulamos que em pacientes com sepse a hipotermia pode ser benéfica.

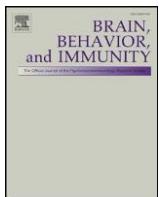
6 – CONCLUSÕES

Utilizando o modelo experimental mais bem aceito para o estudo da inflamação sistêmica (SAPER et al., 2012), ou seja, a administração de LPS, nós demonstramos que o tratamento com inalação de mistura gasosa contendo 2% de H₂ é capaz de modular as respostas cardiovasculares, inflamatórias e termorregulatórias tanto na inflamação moderada, quando severa, induzida por diferentes doses.

Na forma moderada de inflamação sistêmica, esse gás reduz os incrementos nas concentrações de citocinas plasmáticas com atividade pró-inflamatória e na concentração de PGE₂ na POA e potencializa o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Já na forma severa, o H₂ previne a queda na pressão arterial, possivelmente devido a uma redução na liberação de óxido nítrico no plasma ou por algum efeito nos vasos sanguíneos. Além disso, esse gás reduz a resposta de aumento na concentração de moléculas pró-inflamatórias induzida pelo LPS (TNF- α , IL-1 β e PGE₂), enquanto, assim como na inflamação moderada, potencializa o aumento de IL-10 no plasma. Além dessa modulação periférica sobre as moléculas sinalizadores da inflamação, também demonstramos que o H₂ potencializa a hipotermia e reduz a expressiva produção de PGE₂ na POA, um indicador da febre, induzidas por LPS, prevenindo a resposta febril nesse modelo.

Em conjunto, nossos resultados ressaltam, e corroboram os resultados mais atuais a respeito dos potentes efeitos do H₂ como modulador da resposta inflamatória em sistemas biológicos, além de contribuir para a literatura científica com novas evidências que suportam o uso terapêutico desse gás.

7 – APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO



Full-length Article

Molecular hydrogen potentiates hypothermia and prevents hypotension and fever in LPS-induced systemic inflammation

Eduardo A. Saramago^{a,1}, Gabriela S. Borges^{a,1}, Carlitos G. Singolani-Jr^a, Jonatas E. Nogueira^{a,b}, Renato N. Soriano^c, Evelin C. Cárnio^d, Luiz G.S. Branco^{e,□}

^a Medical School of Ribeirão Preto, 14049-900, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^b School of Physical Education and Sports of Ribeirão Preto, 14030-680, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Division of Physiology and Biophysics, Department of Basic Life Sciences, 35010-177, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil

^d Nursing School of Ribeirão Preto, 14040-902, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^e Dental School of Ribeirão Preto, 14040-904, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Endotoxin
TNF- α
IL-1 β
IL-6
IL-10
Sickness syndrome
Sepsis

ABSTRACT

Molecular hydrogen (H_2) exerts anti-oxidative, anti-apoptotic, and anti-inflammatory effects. Here we tested the hypothesis that H_2 modulates cardiovascular, inflammatory, and thermoregulatory changes in systemic inflammation (SI) induced by lipopolysaccharide (LPS) at different doses (0.1 or 1.5 mg/kg, intravenously, to induce mild or severe SI) in male Wistar rats (250–300 g). LPS or saline was injected immediately before the beginning of 360-minute inhalation of H_2 (2% H_2 , 21% O_2 , balanced with nitrogen) or room air (21% O_2 , balanced with nitrogen). Deep body temperature (Tb) was measured by dataloggers pre-implanted in the peritoneal cavity. H_2 caused no change in cardiovascular, inflammatory parameters, and Tb of control rats (treated with saline). During mild SI, H_2 reduced plasma surges of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) while caused an increase in plasma IL-10 (anti-inflammatory cytokine) and prevented fever. During severe SI, H_2 potentiated hypothermia, and prevented fever and hypotension, which coincided with reduced plasma nitric oxide (NO) production. Moreover, H_2 caused a reduction in surges of proinflammatory cytokines (plasma TNF- α and IL-1 β) and prostaglandin E₂ [(PGE₂), in plasma and hypothalamus], and an increase in plasma IL-10. These data are consistent with the notion that H_2 blunts fever in mild SI, and during severe SI potentiates hypothermia, prevents hypotension reducing plasma NO production, and exerts anti-inflammatory effects strong enough to prevent fever by altering febrile signaling and ultimately down-modulating hypothalamic PGE₂ production.

1. Introduction

Sepsis-associated systemic inflammation (SI) in human patients is a complex response with important changes of deep body temperature (Tb) manifested not only as fever but also as hypothermia (Fonseca et al., 2016). These changes are also observed in experimental animals (Romanovsky et al., 2005). Interestingly, Wiewel et al. have recently shown that hypothermia instead of fever during severe SI cannot be easily explained as a switch from proinflammatory to anti-inflammatory condition, but rather may be associated to vascular dysfunctions (Wiewel et al., 2016). Another line of evidence supports the idea that hypothermia may be an adaptive response when the costs of fever exceed its benefits (Steiner et al., 2017). For instance, during food

deprivation, when energy reserves are limited, a role of leptin in SI has been suggested, based on its effects on hypothermia and hypotension. Systemic injection of leptin suppresses plasma TNF- α surges and attenuates hypothermia and hypotension, indicating that leptin exerts anti-inflammatory effects (Flatow et al., 2017). Reconciling the existing data it is clear that the mediators and mechanisms of hypothermia related to SI are still being studied. By the same token, a clear relationship between Tb and mortality rate in a large population study has remained unavailable.

On the other hand, it is now clearly established that the pathophysiological changes observed in SI are primarily mediated by an increased production of prostaglandin E₂ (PGE₂) acting on the anteroventral preoptic region of the hypothalamus (AVPO), the

□ Corresponding author at: Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail address: branco@fop.usp.br (L.G.S. Branco).

¹ The authors contributed equally for the work.

hierarchically most important region involved in thermoregulation (Saper et al., 2012).

Before PGE₂ production is increased, invading microorganisms macromolecules interact with a number of immune system cells. For instance, endotoxin (lipopolysaccharide - LPS; a component of Gram-negative bacterial cell walls) binds toll-like receptor 4 (TLR4) and triggers an intracellular cascade causing the release of a number of cytokines [e.g., tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-1β, IL-6 and IL-10] that eventually cause an increase in PGE₂ production. Moreover, both endogenous [such as the gaseous neuromodulators nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide (Branco et al., 2014)] and exogenous modulators [anti-inflammatory drugs, such as aspirin or ibuprofen, that inhibit prostaglandin synthesis (Saper et al., 2012)] may potentiate or alleviate sickness syndrome.

Molecular hydrogen (H₂) is a colorless, odorless gas that was originally reported physiologically inert in mammalian cells. In 1975, the H₂ therapeutic effects were first documented in squamous carcinoma of mice based on the regression of the skin tumors (Dole et al., 1975). In 2015, Ichihara et al. published an elegant review describing drastic effects of the gas on virtually all organs in a number of conditions including 166 disease models, human diseases, treatment-associated pathologies, besides stress-mediated and inflammatory diseases (Ichihara et al., 2015). Moreover, these actions have been reported to be partially mediated by specific extinctions of hydroxyl radical and peroxynitrite, as well as the modulation of activities and expressions of several key molecules including mediators of inflammation. More recently, H₂ has been reported to react broadly with active substrates in biological systems and has emerged as a novel therapeutic gas with potentially wide applications based on mechanisms related to modulation of oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis, supposedly by means of the activation of the NF-κB and Nrf2/HO-1 signaling pathway (Xie et al., 2014). For instance, H₂ has been suggested to be protective in a number of conditions including ischemia-reperfusion injury, stroke, and sepsis, since the gas presents large efficacy associated with lack of adverse effects, further supporting the notion that H₂ has promising therapeutic effects (George and Agarwal, 2010; Ohta, 2014). According to this notion, septic mice treated with H₂ inhalation have a reduced mortality that seems to be mediated by an inhibition of oxidative stress and inflammation in different tissues (Liu et al., 2014). However, no previous studies assessed the putative actions of H₂ on inflammatory, thermoregulatory and cardiovascular alterations during SI.

Thus, the aim of the present work was to evaluate the effects of H₂ inhalation on vital parameters in the most well accepted experimental model of SI. To attain this goal we injected LPS at two different doses (0.1 and 1.5 mg/kg, i.v., to induce, respectively, mild or severe SI) to rats and measured cardiovascular parameters, deep body temperature (Tb), plasma levels of inflammatory mediators such as TNF-α, IL-1β, IL-6, and PGE₂ (Leon, 2002), as well as an anti-inflammatory mediator (IL-10). In addition to these peripheral markers we also measured AVPO PGE₂ production as a final indicator of the inflammatory status (cf. Branco et al., 2014).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (250-300 g, 7-8 weeks) were obtained from Central Animal Facility of University of São Paulo Campus in Ribeirão Preto. Initially, four animals were caged in controlled conditions of temperature (24 ± 1 °C), humidity (60-65%) and light (06:00 AM-06:00 PM) with water and food *ad libitum*. The experimental protocols began between 07:00 AM and 09:00 AM. All the experimental procedures were approved by the Local Ethical Committee for Animal Use (protocol number #15.1.583.22.3) in agreement with the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals.

2.2. Surgeries

The animals were deeply anesthetized [ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg, intraperitoneal (ip) injection] in order to insert a temperature datalogger capsule (SubCue, Calgary, AB, Canada) into the abdominal cavity of the rat through a median laparotomy. While the animals remained under deep anesthesia, a polyethylene catheter (PE-50 soldered to PE-10; Intramedic, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) was implanted into the left femoral artery for the subsequent recording of cardiovascular parameters [mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR)] and into the left femoral vein for pyrogen-free saline or LPS administration. Catheters were tunneled subcutaneously and exteriorized at the nape of the neck. To prevent blood from clotting, the catheters were filled with a heparinized saline solution (50 IU/ml). The rats were then allowed to recover for 24 h at 22 °C before the experimental protocol began, which was carried out in unanesthetized freely moving animals. This period of time was chosen based on pilot experiments, where we observed that 24 h lead to the most consistent and reproducible results, and based on previous studies (Buttler et al., 2017; Katayama et al., 2015; Sabino et al., 2016).

2.3. Measurements of Tb, MAP and HR

Before the surgeries, the temperature dataloggers capsules were programmed regarding the time of local area, time to start the recordings and sample rate using the SubCue software (SubCue, Calgary, AB, Canada). Recorded data were corrected using a table of correction values for each datalogger supplied by the manufacturer. Tb (specifically, abdominal temperature) was recorded at 5-min intervals using the datalogger. At the time of experiments, in conscious, freely moving rats, the exteriorized arterial catheter was connected to a pressure transducer (MLT 0699, ADInstruments, Bella Vista, Australia), which was connected to an amplifier (Bridge Amp, FE2211861, ADInstruments). A data acquisition system (Powerlab 8/35, PL35080562, ADInstruments) was used to acquire the signals of pulsatile arterial pressure at a sampling rate of 1 kHz and these data were recorded using the corresponding software (Lab Chart Pro v. 7.3.1, Ad Instruments). MAP and HR were determined from the signals of pulsatile arterial pressure (Sabino et al., 2016).

2.4. Plasma sample collection

Rats were decapitated and trunk blood samples were collected in EDTA-coated tubes and centrifuged (3500 rpm for 20 min at 4 °C). Plasma samples were collected at 120 min after LPS because this time coincides with the febrile response observed (Fig. 1) and at 360 min with the end of the experimental period. Samples were then aliquoted and stored at -80 °C until assays (cytokines, nitrate, and PGE₂).

2.5. AVPO sample collection

Brains were quickly collected after decapitation, frozen in dry-ice cold isopentane and stored at -80 °C until sample collection. Bilateral AVPO samples were obtained with a punch needle (0.9 mm inner diameter) in a cryostat from three individual 500-μm thick slices of the preoptic hypothalamus, based on the following landmarks: ventral, optic chiasm; dorsal, anterior commissure; median, the third ventricle. Punches were taken just above the dorsal boundary of the optic chiasm and at the left and right lateral wall of the third ventricle. The brains were cut from their caudal end in order to reach the plane of the anterior commissure, whose most caudal portion corresponds to the most caudal plane of the AVPO (Paxinos and Watson, 1998).

2.6. Measurements of plasma levels of cytokines and PGE₂

Plasma levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, and PGE₂ were measured

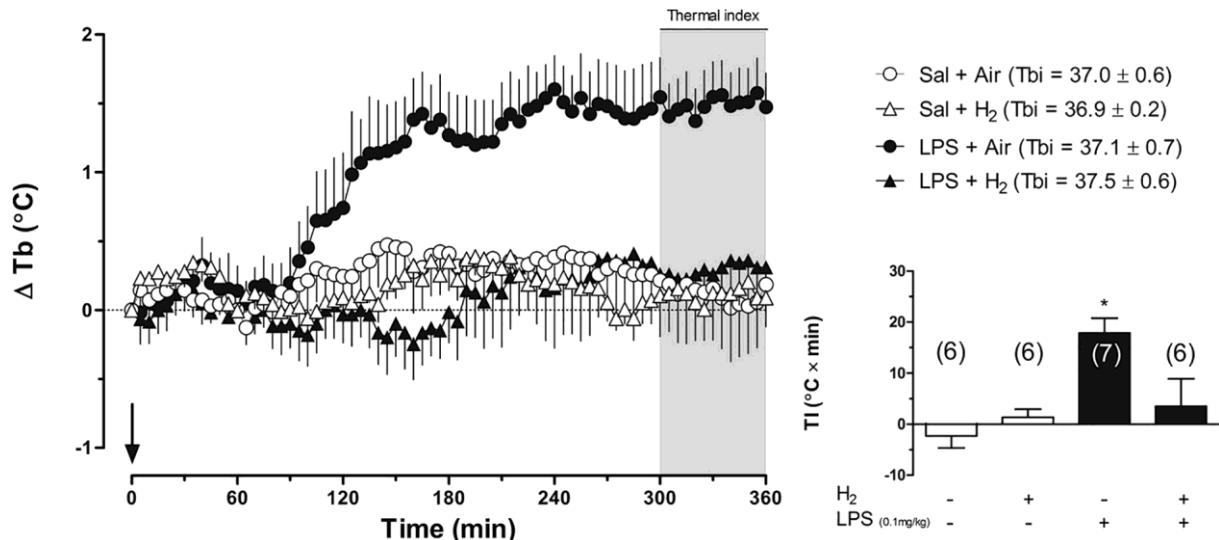


Fig. 1. Left: Changes in deep body temperature (ΔT_b) in response to injection of saline or lipopolysaccharide (LPS, 0.1 mg/kg) combined with inhalation of H_2 or room air. Arrow indicates the moment of LPS or saline injection immediately followed by the 360-min inhalation of H_2 or room air. Right: Thermal index. Data are presented as mean \pm SEM. *Statistical difference, $p < 0.05$, compared with the other groups.

at 120 and 360 min after LPS administration. We used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits for each cytokine (TNF- α #DY510, IL-1 β #DY501, IL-6 #DY506, IL-10 #DY522, and PGE₂ #514010, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The ELISA kits for cytokines and PGE₂ were rat specific.

2.7. Measurements of plasma levels of nitric oxide (nitrate, NO^-)

Plasma NO levels were measured at 120 and 360 min after injection, based on previous studies (Soriano et al., 2012, 2018). Indirect measurement was performed using the chemiluminescence NO/Ozone technique. Nitrate concentrations were measured using 5- μL aliquots of the samples injected in a reaction vase containing the reducer agent that convert nitrate to NO in equimolar amounts (280 NOA; Sievers, Boulder, CO, USA).

2.8. Measurements of AVPO PGE₂

AVPO samples were individually homogenized by ultrasound with a buffer provided by the manufacturer and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at 4°C . The supernatant was collected and subjected to ELISA for PGE₂ (#514010, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and was performed according to the manufacturer's instructions.

2.9. Experimental procedures

SI was induced by intravenous (iv) administration of LPS of *Escherichia coli* (0111: B4, Sigma-aldrich, USA). LPS was diluted to a final concentration of either 0.1 or 1.5 mg/ml in pyrogen-free saline, and the resulting solution was bolus injected (1 mL/kg, iv). The LPS doses administered were low enough to cause fever only (Steiner et al., 2004) using 0.1 mg/kg or high enough to cause hypothermia followed by fever which are accompanied by cardiovascular changes (Giusti-Paiva et al., 2002) using 1.5 mg/kg.

The animals were placed in a sealed plexiglas chamber with inflow and outflow outlets. Gas mixture composed of H_2 (2%), O₂ (21%), and N₂ (77%) was supplied through a gas flowmeter (Cole-Parmer Instrument Company, IL, USA), and delivered into the chamber through a tube at a rate of 2 L/min for 360 min (6 h). The control animals were exposed to room air in the very same chamber at the same flow rate of 2 L/min. The room temperature was maintained at 22°C .

2.10. Statistical analysis

We plotted time courses of Tb recordings as changes (delta) of Tb from basal values (shown as Tbi in Figs. 1 and 4E) were the average of the last 30 min before injection and set as 0 when plotted; then the changes (delta) of Tb were calculated and plotted. Thermal index (TI) is a well-accepted way to emphasize and analyze the amplitude of thermal responses, and is calculated from the area under the curve (AUC) (Emilio-Silva et al., 2017; Mota et al., 2017; Soriano et al., 2018). We set 0 as baseline and calculated AUC of the changes of Tb to emphasize and analyze the amplitude of the febrile response from 300 to 360 min (shown as TI and plotted as bar graphs; Figs. 1 and 4E, right). When the higher dose of LPS was used (1.5 mg/kg), to emphasize and analyze the hypothermia phase (negative) from 30 to 90 min we set 0 as baseline and calculated the area, obviously, above the curve (shown as TI and plotted as bar graphs, Fig. 4E, left). The areas under/above the curve are expressed as degrees Celsius (y-axis) \times minutes (x-axis). Statistical analyses of the areas were done by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. MAP and HR were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. Values of plasma NO₃, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, and PGE₂, as well as AVPO PGE₂ data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

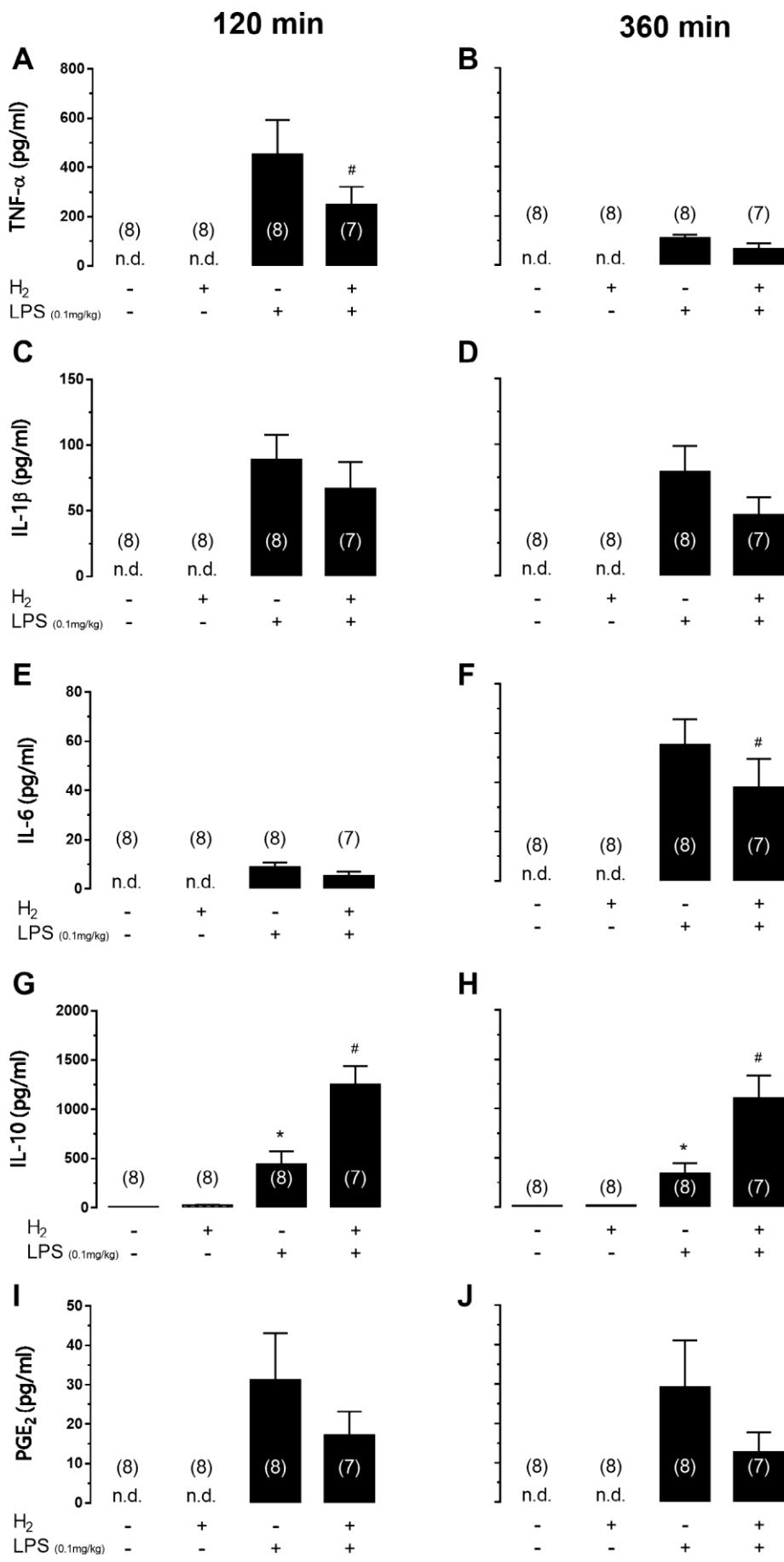
3. Results

3.1. Thermoregulatory and anti-inflammatory effects of H_2 during mild SI

Typical febrile response observed 90 min after injection of LPS - at 0.1 mg/kg, iv, to induce mild SI - to rats inspiring room air was significantly ($p < 0.05$) prevented by inhalation of H_2 (Fig. 1).

Regarding plasma levels of inflammatory cytokines and PGE₂ (Fig. 2), we observed that production of these mediators were not induced by H_2 inhalation (group saline + H_2), and that, as expected, injection of LPS (at 0.1 mg/kg, iv) induced an increase in plasma levels of all of them, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, and PGE₂ (Fig. 2). Of particular importance, the LPS-induced increase in TNF- α at 120 min (Fig. 2A) and in IL-6 at 360 min (Fig. 2F) were significantly ($p < 0.05$) attenuated by H_2 , and the gas significantly ($p < 0.05$) enhanced the LPS-induced increased levels of IL-10 at 120 and 360 min (Fig. 2G, H).

The significant LPS-induced increase in AVPO PGE₂ levels observed in the group LPS (0.1 mg/kg, iv) inspiring room air was prevented by H_2



(caption on next page)

Fig. 2. Plasma levels of TNF- α (A, B); IL-1 β (C, D); IL-6 (E, F); IL-10 (G, H), and PGE₂ (I, J) of rats injected with saline or lipopolysaccharide (LPS, 0.1 mg/kg) that inhaled H₂ or room air, collected at 120 (left) and 360 min (right). Data are presented as mean \pm SEM. n.d., Nondetectable levels. *, Statistical difference, $p < 0.05$, compared with saline groups (IL-10). #, Statistical difference, $p < 0.05$, compared with group LPS + room air.

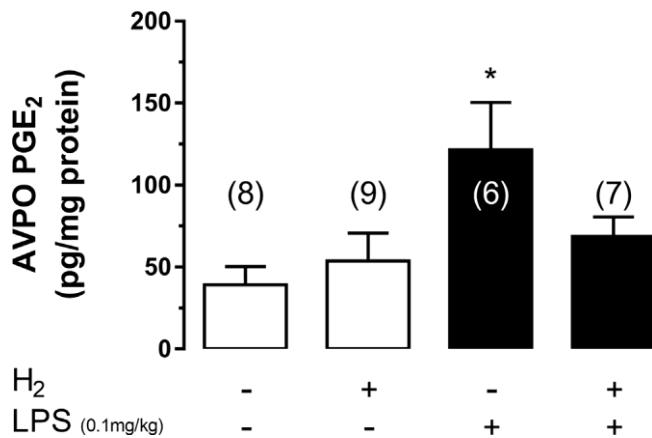


Fig. 3. AVPO PGE₂ concentration (pg/mg) of rats injected with saline or lipopolysaccharide (LPS, 0.1 mg/kg) that inhaled H₂ or room air. The samples were collected 360 min after saline or LPS injection. Data are presented as mean \pm SEM*. Statistical difference, $p < 0.05$, compared with saline groups.

(Fig. 3).

3.2. Cardiovascular and thermoregulatory effects of H₂ during severe SI

The higher dose of LPS (1.5 mg/kg; to induce severe SI) evoked typical arterial hypotension (a drop in MAP, mean arterial blood pressure, 40 min after LPS administration) accompanied by increases in HR (Fig. 4A and B). Interestingly, H₂ prevented the LPS-induced drop in MAP with no effect on HR (Fig. 4A and B).

The observed LPS-induced hypotension coincided with a LPS-induced increase in plasma NO₃⁻ concentration (Fig. 4C), and this increased plasma levels of NO₃⁻ was significantly reduced by H₂ at 120 and 360 min (Fig. 4C, left and right).

Thermoregulatory responses to the higher dose of LPS (1.5 mg/kg) administered to rats inspiring room air included the typical hypothermia followed by fever (Fig. 4D). In the rats treated with the higher LPS dose combined with inhalation of H₂ the hypothermia phase was significantly potentiated (Fig. 4D; Thermal index, Fig. 4E, left) and the febrile response was abolished (Fig. 4D; Thermal index, Fig. 4E, right).

3.3. Anti-inflammatory effects of H₂ during severe SI

Data obtained from plasma and AVPO following administration of the higher LPS dose of 1.5 mg/kg are shown in Figs. 5 and 6. The expected LPS-induced plasma surges of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) and PGE₂ were observed at 120 (Fig. 5, left) and 360 min (Fig. 5, right). Of particular relevance, H₂ significantly reduced the LPS-induced plasma surge of TNF- α (at 120 min; Fig. 5A), IL-1 β (at 120 and 360 min; Fig. 5C, D), and PGE₂ (at 120 and 360 min; Fig. 5I, J), while significantly potentiated the LPS-induced plasma surge of IL-10 (at 120 and 360 min; Fig. 5G, H).

Administration of LPS at 1.5 mg/kg to rats inspiring room air evoked a remarkable increase in AVPO PGE₂ concentration, which was significantly reduced in the rats injected with LPS at the same dose but inspiring H₂ (Fig. 6).

4. Discussion

The present study was the first to document that H₂ was able to

prevent LPS-induced hypotension and that this effect was accompanied by a reduced production of NO in plasma (Fig. 4). Moreover, the gas blunted the release of plasma proinflammatory mediators and concomitantly stimulated the release of an anti-inflammatory mediator (Figs. 2 and 5). The gas, *per se*, had no effect on basal MAP, HR, Tb, NO, and did not alter the production of inflammatory mediators in plasma and AVPO. On the other hand, H₂ potentiated LPS-induced hypothermia and prevented LPS-induced fever.

To provide insights into the mechanisms by which H₂ presents such striking effects during SI, we assessed plasma NO and inflammatory mediators levels. There is evidence that NO plays an immunoregulatory role in SI, which seems to depend on the amount of NO produced. A small amount of NO may enhance the production of proinflammatory mediators possibly through activation of NF- κ B, whereas a large amount of NO may suppress it, possibly through inhibition of NF- κ B (Kobayashi, 2010). Therefore, we speculate that in the present study NO might have exerted an inhibitory effect on plasma cytokines production, mainly when the higher dose of LPS was used. The cytokines we assayed have different roles during SI. TNF- α , IL-1 β and IL-6 appear to be proinflammatory mediators, whereas IL-10 appears to be an anti-inflammatory agent (Schulte et al., 2013).

Typical changes were observed in rats treated with LPS inspiring room air, i.e., LPS-induced fever when using a lower dose (cf. Branco et al., 2014) and LPS-induced drop in MAP, concomitantly with hypothermia followed by fever when using the higher dose, as previously reported (Giusti-Paiva et al., 2002). Severe SI is characterized by hypotension associated with tachycardia. During the initial phase of sepsis-associated SI, sympathetic activation may be enough to keep blood pressure close to normality. The increase in sympathetic tone, among other effects, promotes a reallocation of blood volume with decreased blood flow to non-vital organs (*e.g.* skin and muscles), and systemic vasoconstriction, increasing venous return. The increased venous return associated with increased HR and peripheral resistance may prevent circulatory shock. However, when these adaptive mechanisms are insufficient, hypotension takes place (DellaVolpe et al., 2015).

In the present study, we observed that intravenous administration of LPS caused a drop in MAP (Fig. 4A), associated with an increased HR (Fig. 4B). Hypotension during SI is multifactorial and induces several metabolic and physiological alterations, such as decrease in the adrenergic sensitivity of arterial smooth muscle cells, loss of regulatory function of the endothelial cells on the underlying smooth muscle, and increased NO production by iNOS (Miranda et al., 2016; Sharawy, 2014). This inducible isoform of NOS may be expressed by any cell in the body under appropriate stimuli, including cytokines and LPS (Salvemini et al., 1990; Stuehr et al., 1991). NO is an important modulator of arteriolar smooth muscle cells (resistance vessels), since it is able to activate the enzyme soluble guanylate cyclase (sGC) increasing intracellular levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), the mediator of relaxation of arterial smooth muscle cells (cf. Branco et al., 2014). In fact, NO production during sepsis-associated SI in humans is closely related to hemodynamic disturbances (Gómez-Jiménez et al., 1995; Miranda et al., 2016). In agreement with this notion, we showed that LPS-induced hypotension is rather attenuated in iNOS knockout mice (Carnio et al., 2005). The present data reinforce the fact that NO is one of the key mediators responsible for the drop in blood pressure during LPS-induced hypotension, since plasma concentration of nitrate, a product of NO degradation, was found to be sharply increased during severe SI (Fig. 4C).

Regarding HR, we observed a persistent tachycardia after LPS administration (Fig. 4B), which can be explained by increased cardiac sympathetic activity (DellaVolpe et al., 2015) mediated by baroreflex

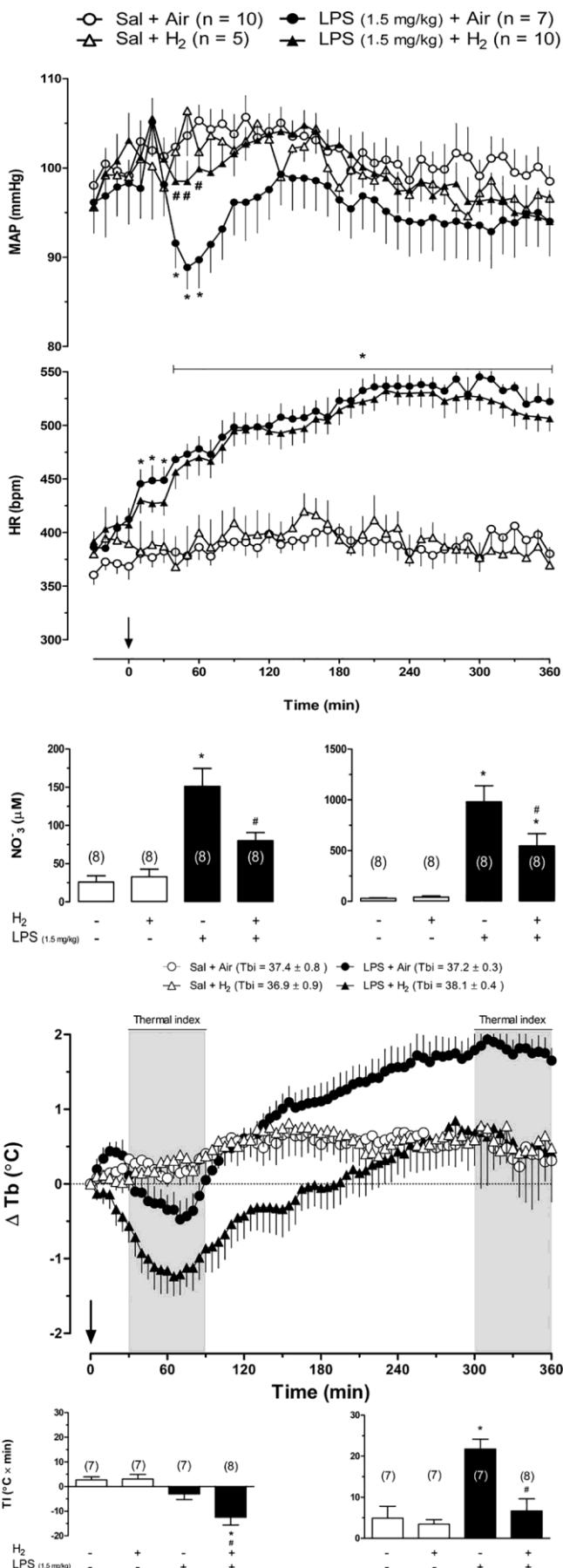


Fig. 4. Effects of H₂ on mean arterial pressure (MAP; panel A), heart rate (HR; panel B), plasma levels of NO (nitrate; at 120 min, panel C, left; at 360 min, panel C, right), and Tb (panel D) of saline-treated rats and rats with severe SI (LPS, 1.5 mg/kg, iv). Thermal indexes (panel E). Arrows indicate the moment of LPS or saline injection immediately followed by the 360-min inhalation of H₂ or room air. Data are presented as mean ± SEM. *, Statistical difference, $p < 0.05$, compared with saline groups. #, Statistical difference, $p < 0.05$, compared with group LPS + room air.

(Roberts, 2016).

NO production is partially mediated by cytokines (Kobayashi, 2010) and thus we speculate that the reduction in plasma NO production caused by H₂ may have resulted from the decreased plasma levels of proinflammatory cytokines. These cytokines ultimately stimulates AVPO PGE₂ production (Saper et al., 2012). In 1971, Milton and Wendlandt were the first to document that intra-cerebral administration of PGE₂ causes a prompt febrile response (Milton and Wendlandt, 1971). Currently, PGE₂ is known as a key molecule involved in the pathophysiological responses mediated by the CNS during SI (Saper et al., 2012).

In the present study, the LPS-induced surges of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were reduced by H₂, whereas the LPS-induced surge of IL-10 was enhanced by the gas. The present results corroborate previous studies demonstrating reduced surges of proinflammatory cytokines in the plasma of rats injected with LPS in different approaches (Xie et al., 2012, 2010a,b; Zhang et al., 2011). Moreover, chronic ingestion of H₂-enriched water improves the outcome of neuroinflammation induced by LPS, which appears to be related to a negative regulation of TNF- α and positive regulation of IL-10 (Spulber et al., 2012). IL-10 is essential for reducing immune responses and preventing immunopathology (Comi et al., 2018). For instance, enhanced inflammatory responses to bacteria-induced immune challenge leading to the development of inflammatory bowel disease has been reported when IL-10 is deficient (Glocker et al., 2009). IL-10 administered in LPS-stimulated mouse microglial cell culture is able to reduce the production of TNF- α , IL1- β , and IL-6 (Sawada et al., 1999). Finally, it is interesting to note that IL-10 can also inhibit NO production by LPS-stimulated macrophages (Cunha et al., 1992). Therefore, it is clear that very complex interactions exist among cytokines themselves and among cytokines and NO, that all together eventually determine the changes in cardiovascular (Fig. 4A) and thermoregulatory (Fig. 4D, E) parameters we assessed during severe SI.

Interestingly, it has been reported that NF- κ B transcription factors control the expression of several genes including the ones involved in modulation of inflammation (Hoesel and Schmid, 2013). Proinflammatory receptors including TNF receptors, Toll-like receptor family, and cytokine receptors for ILs are able to activate the NF- κ B pathway (Morgan and Liu, 2011). By the same token, it is also well known that NF- κ B regulates gene expression of cytokines (Xie et al., 2014). Reconciling the available data, it is clear that NF- κ B plays a key role in the regulation of the inflammatory response to LPS. Interestingly, a recent study reported that H₂ inhalation reduces TNF- α -induced inflammatory responses in endothelial cells by inhibiting the activation of NF- κ B (Song et al., 2011). Additionally, in a recent study H₂ was reported to inhibit the lung NF- κ B p65 nuclear translocation and DNA-binding activity in LPS-challenged mice (Xie et al., 2012).

Besides these evidences indicating that H₂ attenuates the increased levels of proinflammatory cytokines during SI, it has also been reported that the gas causes further increases in the level of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Chen et al., 2013) which was also found in the present study. In conclusion, downstream molecules of the NF- κ B signaling pathway play central roles in SI and H₂ is able to modulate these molecules. A putative mechanism by which H₂ may exert this modulatory effect has been recently proposed by Iuchi and cols (Iuchi et al., 2016) based on the fact that when free radical chain oxidation

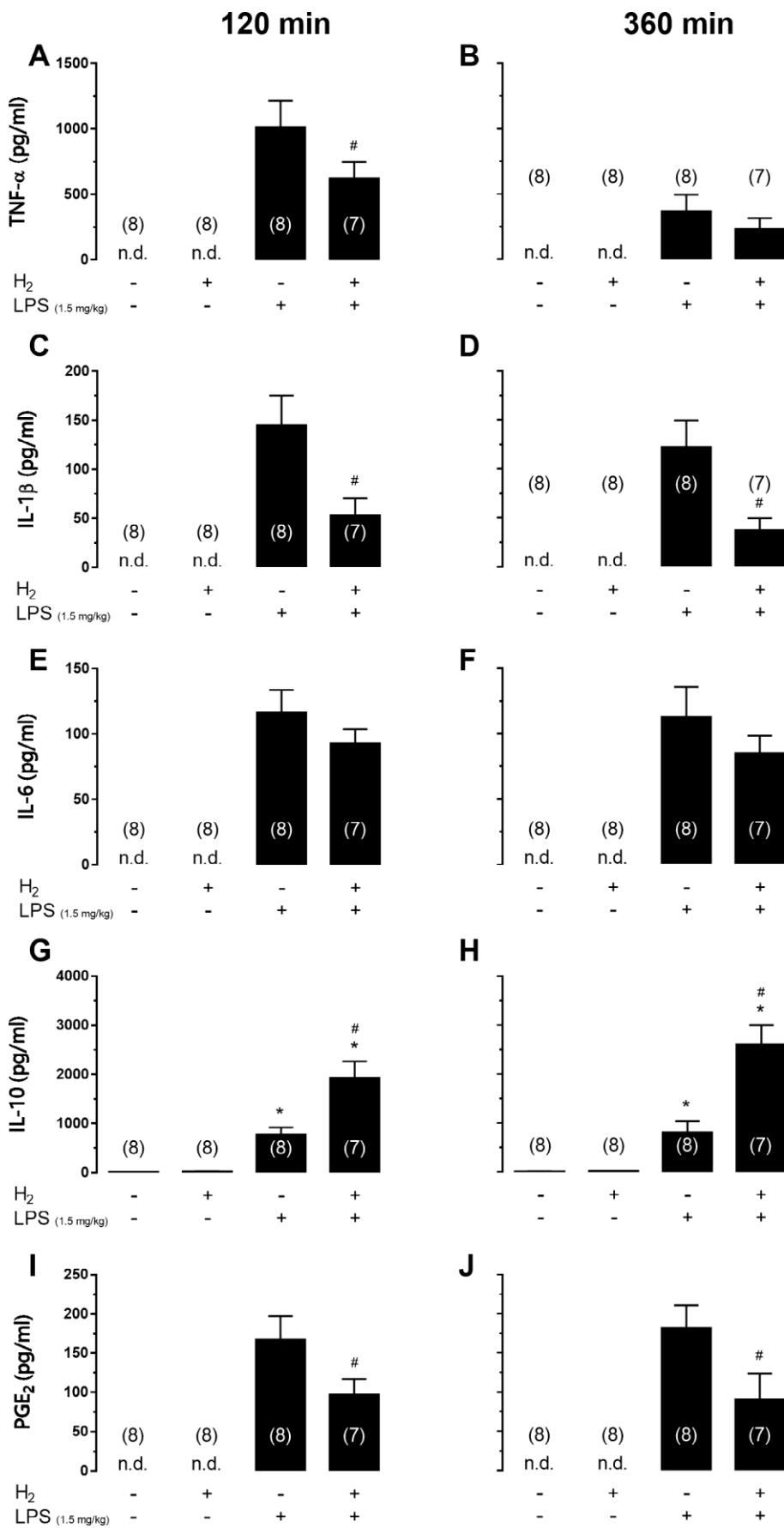


Fig. 5. Plasma levels of TNF- α (A, B); IL-1 β (C, D); IL-6 (E, F); IL-10 (G, H), and PGE₂ (I, J) of rats injected with saline or lipopolysaccharide (LPS, 1.5 mg/kg) that inhaled H_2 or room air, collected at 120 (left) and 360 min (right). Data are presented as mean \pm SEM. n.d., Nondetectable levels. *, Statistical difference, $p < 0.05$, compared with saline groups. #, Statistical difference, $p < 0.05$, compared with group LPS + room air.

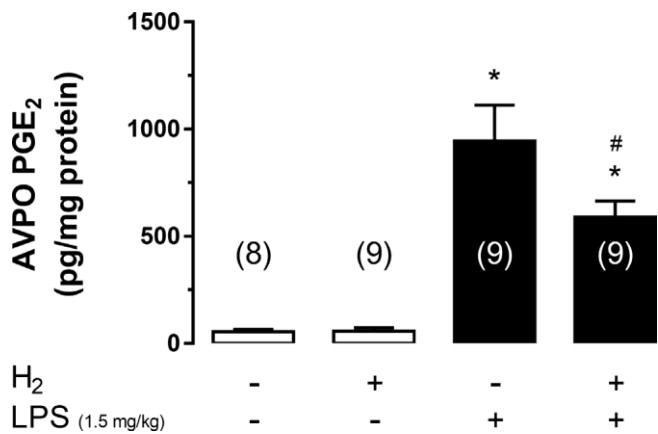


Fig. 6. AVPO PGE₂ concentration (pg/mg) of rats injected with saline or lipopolysaccharide (LPS, 1.5 mg/kg) that inhaled H₂ or room air. The samples were collected 360 min after the saline or LPS injection. Data are presented as mean \pm SEM*. , Statistical difference, $p < 0.05$, compared with saline groups. #, Statistical difference, $p < 0.05$, compared with group LPS + room air.

generates oxidized lipid mediators, calcium signaling is activated. In the presence of H₂, the oxidized phospholipids production would be altered because of a modulation of the free radical chain reactions. The oxidized phospholipids would lead to a reduced calcium signaling, eventually causing inhibition of TNF- α and COXII expressions.

We speculate that the scavenging effects of H₂ on reactive oxygen species (ROS) production might have contributed to the results of the present study. H₂ has been shown to neutralize cellular hydroxyl radical and peroxynitrite, protecting the cells against oxidative stress and acting as an anti-apoptotic and antioxidant molecule (Ishibashi, 2013; Ohta, 2014).

To investigate whether H₂ alters thermoregulatory responses in a severe form of LPS-induced SI, we administered the higher dose of LPS to rats. The higher dose of LPS (1.5 mg/kg) causes the typical hypothermia followed by fever in animals exposed to a sub-neutral ambient temperature (22 °C) (Steiner and Romanovsky, 2007; Székely and Romanovsky, 1998). Interestingly, the hypothermic response to the high dose of LPS was enhanced by H₂. It seems plausible to speculate that H₂ somehow potentiates the hypothermic response to LPS mainly by enhancing cryogenic inflammatory signaling, which may involve PGD₂ and an increased hypothalamic responsiveness to it (Kluger, 1991; Oida et al., 1997). Similar to the effect of H₂ on fever induced by the lower dose of LPS (Fig. 1), the gas also prevented fever during severe SI. We speculate that those drastically attenuated febrile responses evoked by the lower (Fig. 1) and the higher dose of LPS (Fig. 4D, E) were caused by a reduction in LPS-induced cytokines surges (Figs. 2 and 5) and reduced levels of AVPO PGE₂ (Figs. 3 and 6) observed when LPS-treated rats inspired H₂.

One could speculate that the fall in arterial pressure (hypotension) and hypothermia in models of SI are strongly associated since they might even be triggered by the same cell populations in peripheral organs and both take place simultaneously (Al-Saffar et al., 2013). These assumptions are not supported by the present findings since H₂ abolished LPS-induced hypotension whereas potentiated LPS-induced hypothermia. According to Al-Saffar et al. (2013), hypothermia and hypotension are triggered exclusively by LPS acting outside the brain and mechanistic difference between them in SI lies in the downstream, neuronal pathways that drive each response, i.e., lesion of the preoptic area of the hypothalamus reduces LPS-induced hypotension (Yilmaz et al., 2008), whereas lesion of the dorsomedial hypothalamus affects LPS-induced hypothermia and its associated behavior (Almeida et al., 2006a,b). Moreover, whereas hypothermia is thought to be mediated by the brain controlling heat exchange and behavior (Romanovsky et al., 2005), the role of the brain in hypotension may be relatively minor

(Landry and Oliver, 2001). Reconciling the data, we speculate that the effect of H₂ enhancing LPS-induced hypothermia may result from an effect of the gas on the brain, whereas the effect of the gas attenuating LPS-induced hypotension may result from a local effect of the gas on the blood vessels.

Regarding hypothermia itself, it is clear that relatively little is known about the mechanisms responsible for this response, comparing with fever, even though SI-associated hypothermia has been considered important and with substantial clinical significance (Clemmer et al., 1992). Two decades ago hypothermia was considered a failure in thermoregulation in severe SI. On the other hand, in the last decade, this concept was reevaluated in studies showing the existence of specific thermoregulatory mechanisms of hypothermia [cf. (Steiner et al., 2017)]. In the present study, we observed that H₂ inhalation enhanced hypothermia (Fig. 4D, E). Based on the notion that hypothermia represents an adaptive response when the costs of fever exceed its benefits (Steiner et al., 2017), we speculate that in patients with severe sepsis hypothermia could be beneficial.

5. Conclusion

In the most well accepted experimental model of SI (Saper et al., 2012) we showed that H₂ inspired at 2% concentration modulates cardiovascular, inflammatory, and thermoregulatory responses to both mild and severe form of SI. In a mild form of SI, the gas reduces LPS-induced plasma surges of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6),

while potentiates LPS-induced plasma surge of an anti-inflammatory cytokine (IL-10), and blunts LPS-induced increase in AVPO PGE₂ levels preventing fever. In severe SI, H₂ prevents LPS-induced hypotension, possibly by reducing NO release in plasma and/or by some intracellular effects on blood vessels. Moreover, the gas reduces LPS-induced surges of proinflammatory parameters in plasma (TNF- α , IL-1 β , and PGE₂) while potentiates LPS-induced plasma surge of an anti-inflammatory cytokine (IL-10). In addition to the modulatory effects on these peripheral signaling molecules, we also showed that in severe SI the gas potentiates LPS-induced hypothermia, and reduces the remarkable LPS-induced increase in AVPO PGE₂ production (final indicator of the inflammatory status) preventing fever. Taking together, the present findings highlight (and corroborate) potent modulatory effects of the gas on biological systems and add to the literature evidence to further support its promising therapeutic use.

Acknowledgments

The authors thank Mauro F. Silva and Marcelo E. Batalhão for the excellent technical support.

Funding

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) Grant #16/17681-9, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES), Brazil. E.A. Saramago, G.S. Borges, C.G. Singolani-Jr are recipients of graduate scholarships by the CNPq or CAPES. R.N. Soriano was recipient of post-doctoral fellowship by FAPESP.

Financial disclosures

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Almeida, M.C., Steiner, A.A., Branco, L.G.S., Romanovsky, A.A., 2006a. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. *Eur. J. Neurosci.* 23, 3359–3367. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04854.x>.

- Almeida, M.C., Steiner, A.A., Branco, L.G.S., Romanovsky, A.A., 2006b. Neural substrate of cold-seeking behavior in endotoxin shock. *PLoS One* 1, e1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000001>.
- Al-Saffar, H., Lewis, K., Liu, E., Schober, A., Corrigan, J.J., Shibata, K., Steiner, A.A., 2013. Lipopolysaccharide-induced hypothermia and hypotension are associated with inflammatory signaling that is triggered outside the brain. *Brain Behav. Immun.* 28, 188-195. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2012.11.015>.
- Branco, L.G.S., Soriano, R.N., Steiner, A.A., 2014. Gaseous mediators in temperature regulation. In: *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 1301-1338. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130053>.
- Buttler, L., Jordão, M.T., Fragas, M.G., Ruggeri, A., Ceroni, A., Michelini, L.C., 2017. Maintenance of blood-brain barrier integrity in hypertension: a novel benefit of exercise training for autonomic control. *Front. Physiol.* 8, 1048. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01048>.
- Carnio, E.C., Stabile, A.M., Batalhão, M.E., Silva, J.S., Antunes-Rodrigues, J., Branco, L.G.S., Magder, S., 2005. Vasopressin release during endotoxaemic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 450, 390-394. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1400-z>.
- Chen, H.-G., Xie, K.-L., Han, H.-Z., Wang, W.-N., Liu, D.-Q., Wang, G.-L., Yu, Y.-H., 2013. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of molecular hydrogen in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Int. J. Surg.* 11, 1060-1066. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2013.10.007>.
- Clemmer, T.P., Fisher, C.J., Bone, R.C., Slotman, G.J., Metz, C.A., Thomas, F.O., 1992. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The methylprednisolone severe sepsis study group. *Crit. Care Med.* 20, 1395-1401.
- Comi, M., Amadio, G., Gregori, S., 2018. Interleukin-10-producing DC-10 is a unique tool to promote tolerance via antigen-specific T regulatory type 1 cells. *Front. Immunol.* 9, 682. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00682>.
- Cunha, F.Q., Moncada, S., Liew, F.Y., 1992. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 1155-1159.
- DellaVolpe, J.D., Moore, J.E., Pinsky, M.R., 2015. Arterial blood pressure and heart rate regulation in shock state. *Curr. Opin. Crit. Care* 21, 376-380. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000239>.
- Dole, M., Wilson, F.R., Fife, W.P., 1975. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. *Science* 190, 152-154.
- Emilio-Silva, M.T., Mota, C.M.D., Hiruma-Lima, C.A., Antunes-Rodrigues, J., Carnio, E.C., Branco, L.G.S., 2017. Antipyretic effects of citral and possible mechanisms of action. *Inflammation* 40, 1735-1741. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0615-4>.
- Flatow, E.A., Komegaa, E.N., Fonseca, M.T., Brito, C.F., Musteata, F.M., Antunes-Rodrigues, J., Steiner, A.A., 2017. Elucidating the role of leptin in systemic inflammation: a study targeting physiological leptin levels in rats and their macrophages. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 313, R572-R582. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00171.2017>.
- Fonseca, M.T., Rodrigues, A.C., Cezar, L.C., Fujita, A., Soriano, F.G., Steiner, A.A., 2016. Spontaneous hypothermia in human sepsis is a transient, self-limiting, and non-terminal response. *J. Appl. Physiol.* 120, 1394-1401. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00004.2016>.
- George, J.F., Agarwal, A., 2010. Hydrogen: another gas with therapeutic potential. *Kidney Int.* 77, 85-87. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.432>.
- Giusti-Paiava, A., De Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., Carnio, E.C., 2002. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. *Crit. Care Med.* 30, 1306-1310. <https://doi.org/10.1097/00003246-200206000-00025>.
- Glocker, E.-O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E.M., Schäffer, A.A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J., Allroth, A., Murugan, D., Hätscher, N., Pfeifer, D., Sykora, K.-W., Sauer, M., Kreipe, H., Lacher, M., Nustedt, R., Woellner, C., Baumann, U., Salzer, U., Koletzko, S., Shah, N., Segal, A.W., Sauerbrey, A., Buderus, S., Snapper, S.B., Grimbacher, B., Klein, C., 2009. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N. Engl. J. Med.* 361, 2033-2045. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907206>.
- Gómez-Jiménez, J., Salgado, A., Mourelle, M., Martín, M.C., Segura, R.M., Peracaula, R., Moncada, S., 1995. L-Arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit. Care Med.* 23, 253-258.
- Hoesl, B., Schmid, J.A., 2013. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12, 86. <https://doi.org/10.1186/1476-4599-12-86>.
- Ichihara, M., Sobue, S., Ito, M., Ito, M., Hirayama, M., Ohno, K., 2015. Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen - comprehensive review of 321 original articles. *Med. Gas Res.* 5, 12. <https://doi.org/10.1186/s13618-015-0035-1>.
- Ishibashi, T., 2013. Molecular hydrogen: new antioxidant and anti-inflammatory therapy for rheumatoid arthritis and related diseases. *Curr. Pharm. Des.* 19, 6375-6381. <https://doi.org/10.2174/1381612811319990507>.
- Iuchi, K., Imoto, A., Kamimura, N., Nishimaki, K., Ichimiya, H., Yokota, T., Ohta, S., 2016. Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. *Sci. Rep.* 6, 18971. <https://doi.org/10.1038/srep18971>.
- Katayama, P.L., Castania, J.A., Dias, D.P.M., Patel, K.P., Fazan, R., Salgado, H.C., Salgado, H.C., 2015. Role of chemoreceptor activation in hemodynamic responses to electrical stimulation of the carotid sinus in conscious rats. *Hypertension (Dallas, Tex. 1979)* 66, 598-603. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05316>.
- Kluger, M.J., 1991. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.* 71, 93-127. <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.1.93>.
- Kobayashi, Y., 2010. Inadequate production of H₂ by gut microbiota and parkinson disease. *J. Leukoc. Biol.* 88, 1157-1162. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310149>.
- Landry, D.W., Oliver, J.A., 2001. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med.* 345, 588-595. <https://doi.org/10.1056/NEJMra002709>.
- Leon, L.R., 2002. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *J. Appl. Physiol.* 92, 2648-2655. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01005.2001>.
- Liu, L., Xie, K., Chen, H., Dong, X., Li, Y., Yu, Y., Wang, G., Yu, Y., 2014. Inhalation of hydrogen gas attenuates brain injury in mice with cecal ligation and puncture via inhibiting neuroinflammation, oxidative stress and neuronal apoptosis. *Brain Res.* 1589, 78-92. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.030>.
- Milton, A.S., Wendlandt, S., 1971. Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J. Physiol.* 218, 325-336. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009620>.
- Miranda, M., Balarini, M., Caixeta, D., Bouskela, E., 2016. Microcirculatory dysfunction in sepsis: pathophysiology, clinical monitoring, and potential therapies. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 311, H24-H35. <https://doi.org/10.1152/ajpcheart.00034.2016>.
- Morgan, M.J., Liu, Z., 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res.* 21, 103-115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>.
- Mota, C.M.D., Rodrigues-Santos, C., Fernández, R.A.R., Caroline, R.O.G., Antunes-Rodrigues, J., Anselmo-Franci, J.A., Branco, L.G.S., 2017. Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation. *Brain. Behav. Immun.* <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.07.010>.
- Ohta, S., 2014. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol. Ther.* 144, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.04.006>.
- Oida, H., Hirata, M., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohishi, H., Mizuno, N., Ichikawa, A., Narumiya, S., 1997. Expression of messenger RNA for the prostaglandin D receptor in the leptomeninges of the mouse brain. *FEBS Lett.* 417, 53-56. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01253-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01253-2).
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, fourth ed. Academic Press, San Diego.
- Roberts, B.K., 2016. Basic shock physiology and critical care. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 19, 347-360. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2016.01.010>.
- Romanovsky, A.A., Almeida, M.C., Aronoff, D.M., Ivanov, A.I., Konsman, J.P., Steiner, A.A., Turek, V.F., 2005. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front. Biosci.* 10, 2193-2216.
- Sabino, J.P.J., Traslaviña, G.A.A., Branco, L.G.S., 2016. Role of central hydrogen sulfide on ventilatory and cardiovascular responses to hypoxia in spontaneous hypertensive rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 231, 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.05.016>.
- Salvemini, D., Korbut, R., Anggård, E., Vane, J., 1990. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 2593-2597.
- Saper, C.B., Romanovsky, A.A., Scammell, T.E., 2012. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat. Neurosci.* 15, 1088-1095. <https://doi.org/10.1038/nn.3159>.
- Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., Nagatsu, T., 1999. Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J. Neurochem.* 72, 1466-1471.
- Schulte, W., Bernhagen, J., Bucala, R., 2013. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets - an updated view. *Mediators Inflamm.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/65974>.
- Sharawy, N., 2014. Vasoplegia in septic shock: do we really fight the right enemy? *J. Crit. Care* 29, 83-87. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.08.021>.
- Song, G., Tian, H., Liu, J., Zhang, H., Sun, X., Qin, S., 2011. H₂ inhibits TNF-α-induced lectin-like oxidized LDL receptor-1 expression by inhibiting nuclear factor κB activation in endothelial cells. *Biotechnol. Lett.* 33, 1715-1722. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0630-8>.
- Soriano, R.N., Braga, S.P., Breder, J.S.C., Batalhão, M.E., Oliveira-Pelegrin, G.R., Ferreira, L.F.R., Rocha, M.J.A., Carnio, E.C., Branco, L.G.S., 2018. Endogenous peripheral hydrogen sulfide is propyretic: its permissive role in brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Exp. Physiol.* 103, 397-407. <https://doi.org/10.1113/EP086775>.
- Soriano, R.N., Kwiatkoski, M., Batalhão, M.E., Branco, L.G.S., Carnio, E.C., 2012. Interaction between the carbon monoxide and nitric oxide pathways in the locus coeruleus during fever. *Neuroscience* 206, 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.01.021>.
- Spulber, S., Edoff, K., Hong, L., Morisawa, S., Shirahata, S., Ceccatelli, S., 2012. Molecular hydrogen reduces LPS-induced neuroinflammation and promotes recovery from sickness behaviour in mice. *PLoS One* 7, e42078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042078>.
- Steiner, A.A., Dogan, M.D., Ivanov, A.I., Patel, S., Rudaya, A.Y., Jennings, D.H., Orchinik, M., Pace, T.W.W., O'Connor, K.A., Watkins, L.R., Romanovsky, A.A., 2004. A new function of the leptin receptor: mediation of the recovery from lipopolysaccharide-induced hypothermia. *FASEB J.* 18, 1949-1951. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2295fje>.
- Steiner, A.A., Fonseca, M.T., Soriano, F.G., 2017. Should we assume that hypothermia is a dysfunction in sepsis? *Crit. Care* 21, 2016-2017. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1584-y>.
- Steiner, A.A., Romanovsky, A.A., 2007. Leptin: at the crossroads of energy balance and systemic inflammation. *Prog. Lipid Res.* 46, 89-107. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.11.001>.
- Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F., Nathan, C.F., 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7773-7777.
- Székely, M., Romanovsky, A.A., 1998. Pyretic and antipyretic signals within and without fever: a possible interplay. *Med. Hypotheses* 50, 213-218.
- Wieland, M.A., Harmon, M.B., van Vught, L.A., Sciciluna, B.P., Hoogendoorn, A.J., Horn, J., Zwinderman, A.H., Cremer, O.L., Bonten, M.J., Schultz, M.J., van der Poll, T.,

- Juffermans, N.P., Wiersinga, W.J., 2016. Risk factors, host response and outcome of hypothermic sepsis. *Crit. Care* 20, 328. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1510-3>.
- Xie, K., Liu, L., Yu, Y., Wang, G., 2014. Hydrogen gas presents a promising therapeutic strategy for sepsis. *Biomed. Res. Int.* 2014, 807635. <https://doi.org/10.1155/2014/807635>.
- Xie, K., Yu, Y., Huang, Y., Zheng, L., Li, J., Chen, H., Han, H., Hou, L., Gong, G., Wang, G., 2012. Molecular hydrogen ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through reducing inflammation and apoptosis. *Shock* 37, 1. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31824ddc81>.
- Xie, K., Yu, Y., Pei, Y., Hou, L., Chen, S., Xiong, L., Wang, G., 2010a. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release. *Shock* 34, 90-97. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181cdc4ae>.
- Xie, K., Yu, Y., Zhang, Z., Liu, W., Pei, Y., Xiong, L., Hou, L., Wang, G., 2010b. Hydrogen gas improves survival rate and organ damage in zymosan-induced generalized inflammation model. *Shock* 34, 495-501. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181def9aa>.
- Yilmaz, M.S., Millington, W.R., Feleder, C., 2008. The preoptic anterior hypothalamic area mediates initiation of the hypotensive response induced by LPS in male rats. *Shock* 29, 232-237.
- Zhang, Y., Sun, Q., He, B., Xiao, J., Wang, Z., Sun, X., 2011. Anti-inflammatory effect of hydrogen-rich saline in a rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Int. J. Cardiol.* 148, 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.08.058>.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.C., STEINER, A.A., BRANCO, L.G.S., ROMANOVSKY, A.A., 2006a. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. **Eur. J. Neurosci.** 23, 3359–3367. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04854.x>
- ALMEIDA, M.C., STEINER, A.A., BRANCO, L.G.S., ROMANOVSKY, A.A., 2006b. Neural Substrate of Cold-Seeking Behavior in Endotoxin Shock. **PLoS One** 1, e1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000001>
- AL-SAFFAR, H., LEWIS, K., LIU, E., SCHOBER, A., CORRIGAN, J.J., SHIBATA, K., STEINER, A.A., 2013. Lipopolysaccharide-induced hypothermia and hypotension are associated with inflammatory signaling that is triggered outside the brain. **Brain. Behav. Immun.** 28, 188–195. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2012.11.015>
- BONE, R.C., 1991. The pathogenesis of sepsis. **Annals of Internal Medicine** 115, 457–469.
- BRANCO, L.G.S., SORIANO, R.N., STEINER, A.A., 2014. Gaseous Mediators in Temperature Regulation, in: **Comprehensive Physiology**. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 1301–1338. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130053>
- BUTTLER, L., JORDÃO, M.T., FRAGAS, M.G., RUGGERI, A., CERONI, A., MICHELINI, L.C., 2017. Maintenance of Blood-Brain Barrier Integrity in Hypertension: A Novel Benefit of Exercise Training for Autonomic Control. **Front. Physiol.** 8, 1048. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01048>
- CARNIO, E.C., STABILE, A.M., BATALHÃO, M.E., SILVA, J.S., ANTUNES-RODRIGUES, J., BRANCO, L.G.S., MAGDER, S., 2005. Vasopressin release during endotoxaemic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.** 450, 390–394. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1400-z>
- CHEN, H.-G., XIE, K.-L., HAN, H.-Z., WANG, W.-N., LIU, D.-Q., WANG, G.-L., YU, Y.-H., 2013. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of molecular hydrogen in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Int. J. Surg.** 11, 1060–6.

<https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2013.10.007>

CLEMMER, T.P., FISHER, C.J., BONE, R.C., SLOTMAN, G.J., METZ, C.A., THOMAS, F.O., 1992. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. **Crit. Care Med.** 20, 1395–401.

COMI, M., AMODIO, G., GREGORI, S., 2018. Interleukin-10-Producing DC-10 Is a Unique Tool to Promote Tolerance Via Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells. **Front. Immunol.** 9, 682. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00682>

CUNHA, F.Q., MONCADA, S., LIEW, F.Y., 1992. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 182, 1155–9.

DELLAVOLPE, J.D., MOORE, J.E., PINSKY, M.R., 2015. Arterial blood pressure and heart rate regulation in shock state. **Curr. Opin. Crit. Care** 21, 376–380. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000239>

DOLE, M., WILSON, F.R., FIFE, W.P., 1975. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. **Science** 190, 152–4.

EMÍLIO-SILVA, M.T., MOTA, C.M.D., HIRUMA-LIMA, C.A., ANTUNES-RODRIGUES, J., CÁRNIO, E.C., BRANCO, L.G.S., 2017. Antipyretic Effects of Citral and Possible Mechanisms of Action. **Inflammation** 40, 1735–1741. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0615-4>

FLATOW, E.A., KOMEGAE, E.N., FONSECA, M.T., BRITO, C.F., MUSTEATA, F.M., ANTUNES-RODRIGUES, J., STEINER, A.A., 2017. Elucidating the role of leptin in systemic inflammation: a study targeting physiological leptin levels in rats and their macrophages. **Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.** 313, R572–R582. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00171.2017>

FLEISCHMANN, C.; SCHERAG, A.; ADHIKARI, N. K. J.; HARTOG, C. S.; TSAGANOS, T.; SCHLATTMANN, P.; ANGUS, D. C.; REINHART, K. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 3, p. 259–272, 1 fev. 2016.

FONSECA, M.T., RODRIGUES, A.C., CEZAR, L.C., FUJITA, A., SORIANO, F.G., STEINER, A.A., 2016. Spontaneous hypothermia in human sepsis is a transient, self-limiting, and nonterminal response. *J. Appl. Physiol.* 120, 1394–1401. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00004.2016>

FRACASSO, J. F. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 119–127, 2008.

GEORGE, J.F., AGARWAL, A., 2010. Hydrogen: another gas with therapeutic potential. *Kidney Int.* 77, 85–7. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.432>

GIUSTI-PAIVA, A., DE CASTRO, M., ANTUNES-RODRIGUES, J., CARNIO, E.C., 2002. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. *Crit. Care Med.* 30, 1306–1310. <https://doi.org/10.1097/00003246-200206000-00025>

GLOCKER, E.-O., KOTLARZ, D., BOZTUG, K., GERTZ, E.M., SCHÄFFER, A.A., NOYAN, F., PERRO, M., DIESTELHORST, J., ALLROTH, A., MURUGAN, D., HÄTSCHER, N., PFEIFER, D., SYKORA, K.-W., SAUER, M., KREIPE, H., LACHER, M., NUSTEDE, R., WOELLNER, C., BAUMANN, U., SALZER, U., KOLETZKO, S., SHAH, N., SEGAL, A.W., SAUERBREY, A., BUDERUS, S., SNAPPER, S.B., GRIMBACHER, B., KLEIN, C., 2009. Inflammatory Bowel Disease and Mutations Affecting the Interleukin-10 Receptor. *N. Engl. J. Med.* 361, 2033–2045. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907206>

GÓMEZ-JIMÉNEZ, J., SALGADO, A., MOURELLE, M., MARTÍN, M.C., SEGURA, R.M., PERACAULA, R., MONCADA, S., 1995. L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit. Care Med.* 23, 253–8.

HOESEL, B., SCHMID, J.A., 2013. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12, 86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>

ICHIHARA, M., SOBUE, S., ITO, M., ITO, M., HIRAYAMA, M., OHNO, K., 2015. Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen - comprehensive review of 321 original articles -. *Med. Gas Res.* 5, 12. <https://doi.org/10.1186/s13618-015-0035-1>

- ISHIBASHI, T., 2013. Molecular Hydrogen: New Antioxidant and Anti-inflammatory Therapy for Rheumatoid Arthritis and Related Diseases. **Curr. Pharm. Des.** 19, 6375–6381. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990507>
- IUCHI, K., IMOTO, A., KAMIMURA, N., NISHIMAKI, K., ICHIMIYA, H., YOKOTA, T., OHTA, S., 2016. Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. **Sci. Rep.** 6, 18971. <https://doi.org/10.1038/srep18971>
- KATAYAMA, P.L., CASTANIA, J.A., DIAS, D.P.M., PATEL, K.P., FAZAN, R., SALGADO, H.C., SALGADO, H.C., 2015. Role of Chemoreceptor Activation in Hemodynamic Responses to Electrical Stimulation of the Carotid Sinus in Conscious Rats. **Hypertens.** (Dallas, Tex. 1979) 66, 598–603. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05316>
- KLUGER, M.J., 1991. Fever: Role of Pyrogens and Cryogens. **Physiol. Rev.** 71, 93–127. <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.1.93>
- KOBAYASHI, Y., 2010. Inadequate Production of H₂ by Gut Microbiota and Parkinson Disease. **J. Leukoc. Biol.** 88, 1157–1162. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310149>
- LANDRY, D.W., OLIVER, J.A., 2001. The Pathogenesis of Vasodilatory Shock. **N. Engl. J. Med.** 345, 588–595. <https://doi.org/10.1056/NEJMra002709>
- LEON, L.R., 2002. Invited Review: Cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. **J. Appl. Physiol.** 92, 2648–2655. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01005.2001>
- LIU, L., XIE, K., CHEN, H., DONG, X., LI, Y., YU, Y., WANG, G., YU, Y., 2014. Inhalation of hydrogen gas attenuates brain injury in mice with cecal ligation and puncture via inhibiting neuroinflammation, oxidative stress and neuronal apoptosis. **Brain Res.** 1589, 78–92. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2014.09.030>
- MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180–1189, 1 nov. 2017.
- MILTON, A.S., WENDLANDT, S., 1971. Effects on body temperature of prostaglandins of

- the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. **J. Physiol.** 218, 325–336. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009620>
- MIRANDA, M., BALARINI, M., CAIXETA, D., BOUSKELA, E., 2016. Microcirculatory dysfunction in sepsis: pathophysiology, clinical monitoring, and potential therapies. **Am. J. Physiol. Circ. Physiol.** 311, H24–H35. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00034.2016>
- MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240–273, 2009.
- MORGAN, M.J., LIU, Z., 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. **Cell Res.** 21, 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
- MOTA, C.M.D., RODRIGUES-SANTOS, C., FERNÁNDEZ, R.A.R., CAROLINO, R.O.G., ANTUNES-RODRIGUES, J., ANSELMO-FRANCI, J.A., BRANCO, L.G.S., 2017. Central serotonin attenuates LPS-induced systemic inflammation. **Brain. Behav. Immun.** <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.07.010>
- OHTA, S., 2014. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. **Pharmacol. Ther.** 144, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.04.006>
- OIDA, H., HIRATA, M., SUGIMOTO, Y., USHIKUBI, F., OHISHI, H., MIZUNO, N., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S., 1997. Expression of messenger RNA for the prostaglandin D receptor in the leptomeninges of the mouse brain. **FEBS Lett.** 417, 53–56. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01253-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01253-2)
- PAXINOS, G., WATSON, C., 1998. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, fourth ed. Academic Press, San Diego.
- PEREIRA JÚNIOR, G.A., MARSON, F., ABEID, M., OSTINI, F.M., SOUZA, S.H., BASILE-FILHO, A., 1998. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina, Ribeirão Preto.** 31, 349–362.
- ROBERTS, B.K., 2016. Basic Shock Physiology and Critical Care. **Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract.** 19, 347–360. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2016.01.010>

ROMANOVSKY, A.A., ALMEIDA, M.C., ARONOFF, D.M., IVANOV, A.I., KONSMAN, J.P., STEINER, A.A., TUREK, V.F., 2005. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Front. Biosci.** 10, 2193–216.

SABINO, J.P.J., TRASLAVIDA, G.A.A., BRANCO, L.G.S., 2016. Role of central hydrogen sulfide on ventilatory and cardiovascular responses to hypoxia in spontaneous hypertensive rats. **Respir. Physiol. Neurobiol.** 231, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.05.016>

SALVEMINI, D., KORBUT, R., ANGGÅRD, E., VANE, J., 1990. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 87, 2593–7.

SAPER, C.B., ROMANOVSKY, A.A., SCAMMELL, T.E., 2012. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. **Nat. Neurosci.** 15, 1088–1095. <https://doi.org/10.1038/nn.3159>

SARAMAGO, E.A.; BORGES, G.S.; SINGOLANI-JR, C.G.; NOGUEIRA, J.E.; SORIANO, R.N.; CÁRNIO, E.C.; BRANCO L.G.S. (in press). Molecular hydrogen potentiates hypothermia and prevents hypotension and fever in LPS-induced systemic inflammation. **Brain. Behav. Immun.** (Previsão de publicação – setembro/2018). <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.09.027>.

SAWADA, M., SUZUMURA, A., HOSOYA, H., MARUNOUCHI, T., NAGATSU, T., 1999. Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. **J. Neurochem.** 72, 1466–71.

SCHULTE, W., BERNHAGEN, J., BUCALA, R., 2013. Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets - An updated view. **Mediators Inflamm.** 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/165974>

SHARAWY, N., 2014. Vasoplegia in septic shock: Do we really fight the right enemy? **J. Crit. Care** 29, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.08.021>

SINGER, M., et al.; BELLOMO, R.; BERNARD, G. R.; CHICHE, J.; CRAIG, M.; HOTCHKISS, R. S.; LEVY, M. M.; MARSHALL, J. C.; MARTIN, G. S.; OPAL, S. M.; RUBENFELD, G. D.; DER, T. Van; VINCENT, J.; ANGUS, D. C. HHS Public Access.

Jama, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016.

SONG, G., TIAN, H., LIU, J., ZHANG, H., SUN, X., QIN, S., 2011. H₂ inhibits TNF- α -induced lectin-like oxidized LDL receptor-1 expression by inhibiting nuclear factor κ B activation in endothelial cells. **Biotechnol. Lett.** 33, 1715–1722.
<https://doi.org/10.1007/s10529-011-0630-8>

SORIANO, R.N., BRAGA, S.P., BREDER, J.S.C., BATALHAO, M.E., OLIVEIRA-PELEGRIN, G.R., FERREIRA, L.F.R., ROCHA, M.J.A., CARNIO, E.C., BRANCO, L.G.S., 2018. Endogenous peripheral hydrogen sulfide is propyretic: its permissive role in brown adipose tissue thermogenesis in rats. **Exp. Physiol.** 103, 397–407.
<https://doi.org/10.1113/EP086775>

SPULBER, S., EDOFF, K., HONG, L., MORISAWA, S., SHIRAHATA, S., CECCATELLI, S., 2012. Molecular Hydrogen Reduces LPS-Induced Neuroinflammation and Promotes Recovery from Sickness Behaviour in Mice. **PLoS One** 7, e42078.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042078>

STEINER, A.A., DOGAN, M.D., IVANOV, A.I., PATEL, S., RUDAYA, A.Y., JENNINGS, D.H., ORCHINIK, M., PACE, T.W.W., O'CONNOR, K.A., WATKINS, L.R., ROMANOVSKY, A.A., 2004. A new function of the leptin receptor: mediation of the recovery from lipopolysaccharide-induced hypothermia. **FASEB J.** 18, 1949–1951.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-2295fje>

STEINER, A.A., FONSECA, M.T., SORIANO, F.G., 2017. Should we assume that hypothermia is a dysfunction in sepsis? **Crit. Care** 21, 2016–2017.
<https://doi.org/10.1186/s13054-016-1584-y>

STEINER, A.A., ROMANOVSKY, A.A., 2007. Leptin: At the crossroads of energy balance and systemic inflammation. **Prog. Lipid Res.** 46, 89–107.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.11.001>

STUEHR, D.J., CHO, H.J., KWON, N.S., WEISE, M.F., NATHAN, C.F., 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 88, 7773–7.

- SZÉKELY, M., ROMANOVSKY, A.A., 1998. Pyretic and antipyretic signals within and without fever: a possible interplay. **Med. Hypotheses** 50, 213–8.
- THIEMERMANN, C., 1997. Nitric oxide and septic shock. **Gen Pharmacol** 29, 159-66.
- TITHERADGE, M.A., 1999. Nitric oxide and septic shock. **Biochim Biophys Acta** 1411, 437-55.
- WIEWEL, M.A., HARMON, M.B., VAN VUGHT, L.A., SCICLUNA, B.P., HOOGENDIJK, A.J., HORN, J., ZWINDERMAN, A.H., CREMER, O.L., BONTEN, M.J., SCHULTZ, M.J., VAN DER POLL, T., JUFFERMANS, N.P., WIERSINGA, W.J., 2016. Risk factors, host response and outcome of hypothermic sepsis. **Crit. Care** 20, 328. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1510-3>
- XIE, K., LIU, L., YU, Y., WANG, G., 2014. Hydrogen gas presents a promising therapeutic strategy for sepsis. **Biomed Res. Int.** 2014, 807635. <https://doi.org/10.1155/2014/807635>
- XIE, K., YU, Y., HUANG, Y., ZHENG, L., LI, J., CHEN, H., HAN, H., HOU, L., GONG, G., WANG, G., 2012. Molecular Hydrogen Ameliorates Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury in Mice through Reducing Inflammation and Apoptosis. **Shock** 37, 1. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31824ddc81>
- XIE, K., YU, Y., PEI, Y., HOU, L., CHEN, S., XIONG, L., WANG, G., 2010A. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release. **Shock** 34, 90–97. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181cdc4ae>
- XIE, K., YU, Y., ZHANG, Z., LIU, W., PEI, Y., XIONG, L., HOU, L., WANG, G., 2010B. Hydrogen Gas Improves Survival Rate and Organ Damage in Zymosan-Induced Generalized Inflammation Model. **Shock** 34, 495–501. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181def9aa>
- YILMAZ, M.S., MILLINGTON, W.R., FELEDER, C., 2008. The preoptic anterior hypothalamic area mediates initiation of the hypotensive response induced by LPS in male rats. **Shock** 29, 232–7.
- ZHANG, Y., SUN, Q., HE, B., XIAO, J., WANG, Z., SUN, X., 2011. Anti-inflammatory effect of hydrogen-rich saline in a rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion. **Int. J. Cardiol.** 148, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.08.058>