UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RODRIGO ALBERTO RESTREPO FERNÁNDEZ

**Sulfeto de hidrogênio durante o choque endotoxêmico: Modulação da
produção de PGD₂ na AVPO e de citocinas periféricas durante as fases de
hipotermia e febre**

Ribeirão Preto
2017

RODRIGO ALBERTO RESTREPO FERNÁNDEZ

Sulfeto de hidrogênio durante o choque endotoxêmico: Modulação da produção de PGD₂ na AVPO e de citocinas periféricas durante as fases de hipotermia e febre

Tese apresentada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco.

Ribeirão Preto
2017

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 a fonte.

Fernández, Rodrigo Alberto Restrepo

Sulfeto de hidrogênio durante o choque endotoxêmico: Modulação da produção de PGD_2 na AVPO e de citocinas periféricas durante as fases de hipotermia e febre, 2017.

64 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Branco, Luiz Guilherme S.

1. Sulfeto de hidrogênio (H_2S), Choque endotoxêmico, Hipotermia, Febre, Prostaglandina D_2 (PGD_2), Akt, Citocinas.

Nome: FERNÁNDEZ, Rodrigo Alberto Restrepo

Título: Sulfeto de hidrogênio durante o choque endotoxêmico: Modulação da produção de PGD₂ na AVPO e de citocinas periféricas durante as fases de hipotermia e febre.

.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: __/__/__.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, com amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, a saúde e a fortaleza.

À meu orientador, Prof Dr Luiz Guilherme Branco, por todo o compromisso, dedicação, conhecimento, paciência e apoio.

À minha família que sempre é um estímulo, um apoio e uma fonte de inspiração na minha formação.

À Faculdade de Medicina de Riberão Preto, seu corpo docente, seu pessoal administrativo e não docente, por ter me acolhido e ajudado.

À Heloísa Della Coleta Francescato, por ser a melhor colaboradora, companheira e amiga neste processo; também pelo seu conhecimento, paciência e carinho.

À Renato Neri Soriano, Glauce Do Nascimento, João Paulo Sabino, Clarissa Mota, Bruna Maitan, Flavia Turcato e Mauro ferreira por serem amigos e irmãos do doutorado que com conhecimento e bons momentos acompanharam todo o processo.

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

FERNÁNDEZ, R. A. R. **Sulfeto de hidrogênio durante o choque endotoxêmico: Modulação da produção de PGD₂ na AVPO e de citocinas periféricas durante as fases de hipotermia e febre.** 2017. 64 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As respostas termorregulatórias ao lipopolissacarídeo (LPS) são influenciadas por moduladores que aumentam (febrigênicos) ou diminuem (criogênicos) a temperatura corporal (T_b). Entre eles, o neurotransmissor gasoso sulfeto de hidrogênio (H₂S) modula a inflamação sistêmica induzida por endotoxina em ratos, agindo como uma molécula anti-inflamatória e criogênica, embora os mecanismos subjacentes ainda sejam pouco compreendidos. Considerando que a endotoxina é um ligante para o receptor Toll-like 4 (TLR4) e que evidências recentes revelam um cross-talk entre a via de sinalização TLR e fosfo-Akt (p-Akt), o objetivo do presente estudo foi investigar se o H₂S atua como um mediador anti-inflamatório e antipirético durante as fases termorregulatórias que ocorrem no choque endotoxêmico (hipotermia e febre) induzido por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, 2,5 mg/kg intraperitoneal (ip)) através da modulação sobre a produção de prostaglandina D₂ (PGD₂) e a ativação de Akt na área pré-óptica ântero-ventral do hipotálamo (AVPO). A T_b profunda de ratos mantidos a uma temperatura ambiente de 25 °C foi registrada antes e depois da inibição farmacológica da enzima cistationina β-sintase (CBS - responsável pela produção endógena de H₂S no cérebro) usando aminooxiacetato (AOA, 100 pmol/1 µl intracerebroventricular (icv)), combinado ou não com a administração de LPS. Para esclarecer os mecanismos responsáveis por esses ajustes da resposta imune, foram determinados na AVPO os níveis de H₂S, a produção de PGD₂ e o perfil de expressão das proteínas CBS, p-Akt e p-CREB. Além disso, foi analisada a concentração de citocinas plasmáticas (IL-1β, IL-6, IL-10, TNFα, IFN-γ e IL-4). A injeção ip de LPS causou a hipotermia típica seguida de febre. A microinjeção icv de AOA não causou nenhuma alteração na T_b nem na produção basal de PGD₂ durante a eutermia. Os níveis de H₂S na AVPO aumentaram significativamente durante a hipotermia quando comparado com ratos eutérmicos e febris. Em ratos tratados com LPS, o AOA causou uma atenuação na queda da T_b durante a fase de hipotermia e uma febre exacerbada, simultaneamente com o aumento na produção de PGD₂ e a abolição do aumento induzido pela endotoxina na atividade de Akt. Durante a fase de febre, a expressão relativa de CBS esteve significativamente diminuída enquanto a expressão relativa de p-Akt esteve aumentada, quando comparado com ratos eutérmicos e hipotérmicos. As citocinas plasmáticas aumentaram durante a inflamação sistêmica, mas apenas a IL-4 mostrou um padrão semelhante em relação à Akt. Estes dados são consistentes com a noção de que o neurotransmissor gasoso H₂S modula as fases de hipotermia e febre durante o choque endotoxêmico, atuando como uma molécula criogênica. Este papel anti-inflamatório durante a inflamação sistêmica envolve uma regulação positiva da PGD₂, de Akt e da IL-4 plasmática.

Palavras Chave: Sulfeto de hidrogênio (H₂S), Choque endotoxêmico, Hipotermia, Febre, Prostaglandina D₂ (PGD₂), Akt, Citocinas.

ABSTRACT

FERNÁNDEZ, R. A. R. **Hydrogen sulfide during endotoxic shock: Modulation of PGD₂ production in AVPO and peripheral cytokines during hypothermia and fever.** 2017. 64 p. Tese (PhD degree) – Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2017.

Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide (LPS) are affected by modulators that increase (pro-pyretic) or decrease (cryogenic) body temperature (T_b). Among them, the gaseous messenger hydrogen sulfide (H₂S) modulates endotoxin-induced systemic inflammation being an anti-inflammatory and cryogenic molecule, although the underlying mechanisms are still poorly understood. Since endotoxin is a Toll-like receptor 4 (TLR4) ligand and recent evidence indicates that there is a possible cross-talk between the TLR and phospho-Akt (p-Akt) signaling pathway, the current study aimed to investigate whether H₂S acts as an anti-inflammatory and anti-pyretic mediator during thermoregulatory phases of endotoxic shock (hypothermia and fever) induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS, 2.5 mg/kg intraperitoneal (ip)) through the modulation of prostaglandin D₂ (PGD₂) production and activation of Akt in the anteroventral preoptic region of the hypothalamus (AVPO). Deep T_b in rats kept at an ambient temperature of 25 °C, was recorded before and after pharmacological inhibition of the enzyme cystathionine β-synthase (CBS – responsible for H₂S endogenous production in the brain) using aminooxyacetate (AOA; 100 pmol/1 μl intracerebroventricular (icv)) combined or not with endotoxin administration. To clarify the mechanisms responsible for these adjustments on immune response were verified in the AVPO H₂S levels, PGD₂ production and expression profiles of CBS, p-Akt and p-CREB. In addition, plasma cytokines concentration (IL-1β, IL-6, IL-10, TNFα, IFN-γ, and IL-4) was analyzed. Intraperitoneal injection of LPS caused typical hypothermia followed by fever. Intracerebroventricular microinjection of AOA neither affected T_b nor basal PGD₂ production during euthermia. Levels of AVPO H₂S were significantly increased during hypothermia when compared to both euthermic and febrile rats. In LPS-treated rats, AOA increased T_b values during hypothermia and fever, along with enhanced PGD₂ production and abolition of endotoxin-induced increase in Akt activity. During fever, CBS relative expression was significantly decreased whereas p-Akt was significantly increased when compared to both euthermic and hypothermic rats. Plasma cytokines were increased during systemic inflammation, but only IL-4 showed a similar pattern in relation to Akt. These data are consistent with the notion that the gaseous messenger H₂S modulates hypothermia and fever during endotoxic shock, acting as a cryogenic molecule. This anti-inflammatory role during systemic inflammation involves a H₂S-induced up-modulation of PGD₂, Akt and plasma IL-4.

Key words: Hydrogen sulfide (H₂S), Endotoxic shock, Hypothermia, Fever, Prostaglandin D₂ (PGD₂), Akt, Cytokines.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
2.1 Animais.....	15
2.2 Cirurgias	15
2.3 Drogas.....	16
2.4 Microinjeção no 3V e injeção ip.....	16
2.5 Registro da T _b	16
2.6 Amostragem da AVPO.....	17
2.7 Dosagem de H ₂ S na AVPO	17
2.8 Dosagem de PGD2 na AVPO e no plasma.....	18
2.9 Western blot.....	18
2.10 Dosagem de citocinas plasmáticas.....	19
2.11 Protocolos experimentais.....	20
2.11.1 Experimento 1.....	20
2.11.2 Experimento 2.....	20
2.11.3 Experimento 3.....	20
2.12 Análise estatística.....	20
3 RESULTADOS	22
3.1 Efeito da administração da AOA na T _b durante eutermia.....	23
3.2 Efeito da administração do AOA nas fases de hipotermia e febre do choque endotoxêmico.....	23
3.3 Taxa de produção de H ₂ S na AVPO.....	25
3.4 Efeito da administração de AOA na produção de PGD2 na AVPO.....	25
3.5 Efeito da administração de AOA na produção de PGD2 no plasma.....	26
3.6 Expressão relativa da enzima CBS na AVPO.....	27
3.7 Efeito da administração de AOA na AVPO na expressão relativa da enzimas p-Akt e p-CREB.....	28
3.8 Efeito da administração de AOA na AVPO, na produção de citocinas plasmáticas.....	30
4 DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO A – Artigo publicado no periódico <i>Brain Research</i>	49

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, em Inglês) – denominada sepse quando resulta de uma infecção – é um estado grave que causa desde leves anormalidades nos sinais vitais até disfunção de múltiplos órgãos (BENTZER et al., 2015; LASZLO et al., 2015). Sua mais grave consequência é o choque séptico (denominado choque endotoxêmico quando causado pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS)), que é caracterizado pela hipotensão arterial prolongada (ANGUS DC; VAN DER POLL T, 2013) e está associado a altas taxas de mortalidade (20-50% nos EUA) (GAIESKI et al., 2013). Apesar dos grandes avanços na compreensão da fisiopatologia do choque séptico e no uso de tratamentos de suporte em unidades de terapia intensiva (por exemplo: terapia com antibióticos e reposição de fluidos), este continua sendo a causa mais comum de morte em pacientes hospitalizados (ALBERTI et al., 2005; ANGUS; WAX, 2001). Na patogênese do choque séptico observam-se mudanças importantes na temperatura corporal (T_b) (ZOTOVA et al., 2016), mas os mecanismos responsáveis por essas alterações termorregulatórias são desconhecidos. Em primeiro lugar, instala-se a hipotermia (T_b central $\leq 36^\circ\text{C}$), uma estratégia de conservação de energia metabólica quando a inflamação sistêmica é o bastante severa para comprometer a perfusão tecidual e/ou quando as reservas energéticas do organismo poderiam ser ameaçadas pelo alto custo energético da febre (ALMEIDA et al., 2006; LIU et al., 2012). Seguidamente ocorre a febre (T_b central $\geq 38^\circ\text{C}$) (ROMANOVSKY et al., 1996), cuja função protetora consiste em retardar o crescimento de microrganismos e melhorar as respostas imunes do hospedeiro (BLATTEIS, 2006; KRALL et al., 2010). Tanto a dose de LPS quanto a temperatura ambiente determinam a magnitude de ambas as fases termorregulatórias (RUDAYA et al., 2005) e consequentemente o prognóstico clínico (ROMANOVSKY et al., 2002; LI et al., 2015). Embora os mecanismos responsáveis pela hipotermia e a febre não estão bem esclarecidos, acredita-se que elas são desencadeadas por sinais na periferia e moduladas pelo cérebro, onde a região pré-óptica ântero-ventral do hipotálamo (AVPO) desempenha um importante papel termorregulador (MORRISON; NAKAMURA, 2011). Na AVPO, destacam-se o núcleo mediano (MnPO) que recebe as aferências dos termorreceptores periféricos, internos (viscerais) e centrais, assim como a AVPO medial, que contém neurônios sensíveis ao calor (os chamados “warm-sensitive neurons”), que inibem tonicamente a atividade de outros neurônios do sistema termorregulador localizados em outros núcleos hipotalâmicos e em regiões mais caudais do encéfalo. Durante a febre e na anapirexia ocorrem fenômenos fisiológicos caracterizados pela ativação de muitas células e mediadores químicos, que interagem entre eles para produzir na AVPO respostas ainda pouco conhecidas.

O LPS é uma endotoxina da membrana externa de bactérias Gram-negativas composta por moléculas de polissacarídeos, lipídeos e proteínas. Dose baixa ou moderada de LPS (50 a 100 µg/kg, ip) induz febre em qualquer que seja a temperatura ambiente, enquanto que dose alta induz choque endotoxêmico, que estará associado à ocorrência de anapirexia se o rato estiver em ambiente isotérmico com temperatura subneutra (por exemplo, 22°C) ou em ambiente heterotérmico (ALMEIDA et al., 2006). A porção lipídica do LPS estimula monócitos, macrófagos e mastócitos, principalmente no fígado, baço e pulmões (STEINER et al., 2006; AL-SAFFAR et al., 2013) a produzirem mediadores proteicos, lipídicos e radicais livres. No controle da T_b destacam-se citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as interleucinas (IL) 1 β , 6 e 8, e o interferon- γ (IFN- γ) (BLATTEIS, 2006; ROMANOVSKY et al., 2005). Geralmente estes moduladores da inflamação seguem uma via de sinalização da periferia até o sistema nervoso central (SNC) que parece depender de fibras aferentes vagais, de órgãos circunventriculares que não contêm barreira hemato-encefálica, das interação com células localizadas na interface hemato-encefálica ou do transporte ativo pela barreira hemato-encefálica (BLATTEIS, 2006; ROMANOVSKY et al., 2005). Por meio destas vias (aferentes) a sinalização converge da periferia para a AVPO, onde haverá uma maior produção de prostaglandinas (PG) que são os moduladores inflamatórios (eicosanóides) mais importantes (BLATTIES, 2006), que resultam do metabolismo do ácido araquidônico derivado dos fosfolípidos das membranas plasmáticas, pela via da ciclo-oxigenase (COX). A prostaglandina E₂ (PGE₂) é o prostanóide febrigênico mais importante durante a inflamação sistêmica, tanto nos tecidos periféricos quanto no cérebro (STEINER et al., 2006). Por outro lado, a PGD₂ é considerada o principal prostanoide produzido no cérebro (SHIMIZU et al., 1979) que exerce um efeito criogênico em condições fisiológicas (sono), patológicas (sepsis induzida por LPS (UENO et al., 1982) e durante a hipotermia induzida pela privação alimentar (KRALL et al., 2010)). Além destes efeitos, as PG induzem alterações na expressão de proteínas da via de sinalização fosfoinositol 3 quinase (PI3K - Akt e CREB) e da COX-2 (CHOE et al., 2017). A Akt (também denominada proteína quinase B) é uma enzima de transdução de sinal que modula as respostas inflamatórias e a sobrevivência celular (PADIYA et al., 2014; NOSHITA et al., 2002; WILLIAMS et al., 2006; ZHOU et al., 2008). Entre os efetores da Akt está o CREB, um conhecido fator de transcrição dependente de fosforilação relacionado com a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, particularmente em neurônios (WANG et al., 2016; FREITAS et al., 2013). A participação destas moléculas em vários processos fisiológicos e patológicos, assim como seu papel potencial na terapia de múltiplas doenças é alvo de muitas pesquisas, mas não há relatos na literatura em relação à

função destas proteínas durante as fases de hipotermia e febre no choque endotoxêmico.

Há evidência de que moduladores produzidos endogenamente aumentam ou diminuem a resposta inflamatória à endotoxina. Neurotransmissores gasosos como o óxido nítrico (NO) (STEINER et al., 2002a, 2002b), o monóxido de carbono (CO) (STEINER; BRANCO, 2001) e mais recentemente o sulfeto de hidrogênio (H₂S) (KIMURA, 2015), atuam no cérebro modulando a resposta imune. Entre eles, o H₂S - produzido no sistema nervoso central pela enzima cistationina β-sintase (CBS) - é um gás incolor, solúvel em água, com odor semelhante ao de ovo em estado de putrefação, que atua como mensageiro gasoso endógeno com relevância fisiológica (ABE; KIMURA, 1996; BLACKSTONE et al., 2005), agindo inclusive como modulador em modelos animais de inflamação sistêmica (LI et al., 2005, 2009). Os astrócitos da AVPO são lugar comum de produção de H₂S e também de PGE₂ (Blatteis, 2006). Além disso, o H₂S modula as respostas termorregulatórias agindo como um mediador criogênico na AVPO durante a hipotermia induzida por hipóxia (KWIATKOSKI et al., 2012) e na febre causada por dose baixa de LPS (KWIATKOSKI et al., 2013). Além disso, desempenha um poderoso efeito anti-inflamatório (LI et al., 2011), em parte através da ativação (fosforilação) de Akt (LIU et al., 2014). No entanto, é desconhecida a modulação do H₂S durante as fases termorregulatórias do choque endotoxêmico, assim como o mecanismo pelo qual este gasotransmissor exerce sua função antipirética na AVPO.

Considerando que o H₂S altera a atividade neuronal (COBB; COLE, 2015; KIMURA et al., 2012; KIMURA, 2015), inibe a atividade do fator nuclear kappa B (NF-κB, um factor de transcrição fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção) (LEE et al., 2009) e provoca ajustes termorregulatórios na AVPO, o objetivo deste estudo foi verificar a hipótese de que este neurotransmissor gasoso produzido endogenamente no SNC, modula as fases de hipotermia e febre observadas durante o choque endotoxêmico induzido com alta dose de LPS, atuando como uma molécula anti-inflamatória e antipirética, utilizando um inibidor farmacológico da CBS. Para investigar os mecanismos responsáveis por essas respostas, foi medida a produção de (PGD₂) na AVPO e no plasma, assim como a expressão relativa de proteínas da via PI3K (fosfo-Akt (p-Akt) e fosfo CREB (p-CREB)) na AVPO e a concentração plasmática de citocinas pro e anti-inflamatórias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, procedentes do Biotério central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Inicialmente, grupos de quatro animais foram mantidos em câmara com temperatura controlada a 25 °C (modelo: ALE 9902001, Alesco Ltda., Monte Mor, SP, Brasil) com um ciclo claro-escuro de 12:12 h (acesso as 6:00 da manhã) e livre acesso a água e ração de alimento. Os ratos pesaram uma média de 290 g (variando de 280 a 360 g) no início dos experimentos. Após as cirurgias, os animais foram mantidos em caixas individuais. Depois de uma semana de recuperação e aclimação, os experimentos foram realizados entre às 8:00 e às 10:00 da manhã em ratos não-anestesiados com livre movimentação. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA), número de processo: 2013.1.1414.58.0.

2.2 Cirurgias

Sete dias antes do início dos protocolos experimentais, os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia profunda com cetamina-xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente; 1 ml/kg, intraperitoneal, ip) e receberam dose suplementar sempre que foi necessário. Para as medidas de hipotermia e febre os ratos foram implantados com um sensor de temperatura ('datalogger'; SubCueTM, Calgary, AB, Canadá) na cavidade peritoneal pela técnica de laparotomia mediana. Imediatamente, foi feita a cirurgia estereotáxica para implantar uma cânula guia de aço inoxidável (16 mm de comprimento, diâmetro externo de 22 mm) no terceiro ventrículo (3V) para administração intracerebroventricular (icv) de solução salina esteril ou Aminoácetato (AOA). Foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas: barra incisiva: -3,3 mm; anteroposterior: 0,4 mm caudal ao Bregma; lateral: 0,0 mm (na linha média); dorsoventral: 4,5 mm da superfície do crânio (PAXINOS; WATSON, 2007). Foi feita uma incisão na pele sobre a sutura sagital, o periósteo dissecado e a cânula fixada ao crânio por meio de cimento acrílico odontológico. Para manter a permeabilidade e prevenir a infecção, a luz da cânula foi temporariamente obstruída por um mandril de aço inoxidável. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram tratados com antibiótico (160.000 U/kg de benzilpenicilina; 33,3 mg/kg de streptomina e 33,3 mg/kg de dihidrostreptomina; 1 ml/kg, intramuscular) e analgésico (Flunixin meglumina; 2,5 mg/kg, 1 ml/kg, subcutâneo) e colocados em caixas individuais. O período de recuperação foi de pelo menos seis dias.

2.3 Drogas

O choque endotoxêmico foi induzido pela injeção ip de uma dose de 2.5 mg/kg de endotoxina obtida de *Escherichia coli* (LPS sorotipo 0111:B4), como descrito na literatura (KRALL et al., 2010). A inibição irreversível da enzima CBS foi feita com Aminooxiacetato (AOA). As drogas foram adquiridas na Sigma (St. Louis, MO, EUA) e dissolvidas em solução salina estéril.

2.4 Microinjeção no 3V e injeção ip

Durante todo o experimento, incluindo o período noturno, os ratos foram mantidos em câmara com temperatura controlada a 25 °C. Para a realização da microinjeção icv, foi utilizada uma seringa de 5 µl (Hamilton, Reno, NV, EUA) conectada a uma agulha de microinjeção (diâmetro externo de calibre 30) com um tubo de polietileno (PE 10). As extensões ip e icv foram preenchidas com as drogas de interesse ou seus veículos e a administração foi realizada em ratos com movimentação livre. A agulha injetora foi 4,0 mm mais comprida que a cânula guia (20 mm) para atingir o 3V e foi inserida apenas no momento da microinjeção. A microinjeção icv precedeu a injeção ip de LPS (2,5 mg/kg) ou veículo (salina estéril). As doses de AOA (Kwiatkoski et al., 2013) e LPS (conhecida por ativar a sinalização criogênica e febril (STEINER et al., 2009)) estiveram baseadas na literatura. As drogas ou seus veículos foram administrados às 10:00 da manhã, e os ratos permaneceram sem perturbações até o final dos protocolos.

2.5 Registro da T_b

A T_b dos animais foi registrada durante todo o experimento (1 h antes e 3 h depois da administração de LPS), em intervalos de 5 em 5 minutos, pelo sensor de temperatura ('datalogger') previamente inserido na cavidade peritoneal. A média dos valores de T_b registrados durante 60 min antes de qualquer manipulação foi calculada para a determinação da T_b inicial (basal).

2.6 Amostragem da AVPO

A resposta de hipotermia induzida por LPS é bem conhecida por exibir um nadir em torno de 60 minutos após o LPS (KRALL et al., 2010). Considerando que na padronização do experimento a maior queda no valor da T_b ocorreu 85 minutos após a administração das drogas, as análises desta fase termorregulatória foram feitas em animais decapitados depois deste período de tempo. Os animais eutérmicos (injetados com salina estéril) e os animais na fase de febre foram decapitados 3 h após a injeção ip e a microinjeção icv, porque a resposta febril no choque endotoxêmico se estabelece neste período (GIUSTI-PAIVA et al., 2002; KWIATKOSKI et al., 2013). Imediatamente depois da decapitação, os encéfalos foram rapidamente removidos, congelados por imersão em isopentano resfriado em gelo seco e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os encéfalos foram cortados em criostato a partir de sua extremidade caudal com o objetivo de alcançar o plano da comissura anterior, cuja porção mais caudal corresponde ao plano mais caudal da AVPO (PAXINOS; WATSON, 2007). Neste nível foi seccionada uma fatia de $500\text{ }\mu\text{m}$ de espessura que incluiu a totalidade da área pre-óptica medial e o posicionamento da cânula guia e/ou da agulha injetora foi verificado. Amostras bilaterais foram removidas desta fatia com uma agulha de punch de $0,9\text{ mm}$ de diâmetro interno, nas bordas laterais do 3V, acima do quiasma óptico (Figura 3C). As amostras foram homogeneizadas sobre o gelo utilizando um sonicador (Virtis, Gardiner, NY, EUA) com o volume de solvente apropriado para o tipo de ensaio em questão.

2.7 Dosagem de H_2S na AVPO

A concentração de H_2S foi medida como descrito na literatura (FRANCESCATO et al., 2011; KWIATKOSKI et al., 2012, 2013). Resumidamente, as amostras bilaterais da AVPO foram homogeneizadas, sobre gelo, em um tampão de fosfato de potássio ($100\text{ }\mu\text{l}$; 100 mM ; pH 7,4) com um microprocessador (VirTis, Gardiner, NY, USA). Em cada homogenato foram também adicionados $50\text{ }\mu\text{l}$ de solução de PBS, contendo os substratos L-cisteína (1 mM), homocisteína (1 mM) e piridoxal 5'-fosfato (2 mM). A reação foi realizada em tubos plásticos de $1,5\text{ ml}$ e iniciada através da transferência dos tubos para um banho a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a incubação durante 2 h, acetato de zinco (1% , $60\text{ }\mu\text{l}$) foi adicionado para sequestrar o H_2S formado. Em seguida foi adicionado ácido tricloro acético (10% , $45\text{ }\mu\text{l}$) para precipitar as proteínas e, assim, parar a reação. Após centrifugação a 3000 rotações por minuto (rpm) a 25

°C, foi adicionado sulfato de N,N-dimetil-p-fenilenodiamina (20 mM; 25 µl) em HCl 7,2 M, seguido de FeCl₃ (30 µM, 25 µl) em HCl 1,2 M. Cinquenta microlitros do sobrenadante foram usados para realizar a medida da densidade óptica a 670 nm em um leitor de placa (BioTek, Winooski, VT, EUA). A curva de calibração da absorbância foi obtida usando uma solução de Na₂S (0,1 – 100 ng/ml). A concentração de proteínas das amostras (5 µl retirados do homogenato e posteriormente diluídos) foi feita pelo método de “Bradford”, como recomendado pelo fabricante (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, EUA; número de catálogo: 500-0205).

2.8 Dosagem de PGD2 na AVPO e no plasma

Os níveis de PGD2 foram determinados usando o kit de imunoensaio (Prostaglandin PGD2-MOX EIA Kit; Cayman Chemical, MI, USA e PGE2 EIA Kit – Monoclonal) de acordo com as instruções do fabricante. Amostras do plasma (diluição 1:50) e amostras bilaterais da AVPO foram diluídas em buffer EIA e homogeneizadas (VirTis, Gardiner, Nova Iorque, EUA) sobre gelo. Em seguida, os homogenatos foram tratados com methoxylamine hydrochloride (MOX-HCL) para converter a PGD2 em PGD2-MOX (um derivado MOX estável) e prevenir a sua degradação química. As amostras foram reconstituídas em tampão de ensaio providenciado no kit e a sua densidade óptica foi medida a 420 nm.

2.9 Western blot

Foi quantificada a expressão relativa das proteínas CBS, p-Akt e p-CREB na AVPO. Amostras bilaterais da AVPO foram homogeneizadas (VirTis, Gardiner, Nova Iorque, EUA) a 4 °C em tampão de lise contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0.1% de SDS, 1 µg/ml de aprotinin, 1 µg/ml de leupeptin, 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro, 1 mM de ortovanadato de sódio (pH 10), 1 mM de pirofosfato de sódio, 25 mM de fluoruro de sódio e 0.001 M de EDTA (pH 8). Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 40.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram extraídos e alíquotas contendo 30 µg de proteína separadas e congeladas a -80 °C para as posteriores ensaios. A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA). As alíquotas foram diluídas em tampão de corrida, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida

dodecil sulfato de sódio (12%), depois transferidas a membranas de nitrocelulose, incubadas durante 1 h em 50 mL de tampão de bloqueio das ligações inespecíficas (TBS, leite 2.5%) e lavadas em tampão TBS-T (TBS, Tween 20 0.1%, pH 7.6). Depois as membranas foram incubadas overnight com os anticorpos primários correspondentes em albumina de soro bovino (BSA) 5% a 4 °C. Os anticorpos primários monoclonais que foram usados incluíram anti-mouse CBS, anti-mouse phospho-Akt e anti-rabbit phospo-CREB (1:1,000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Finalmente as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (1:5,000; Dako, Glostrup, Denmark) em BSA 5% durante 1 h a temperatura ambiente. As proteínas foram detectadas usando um kit de quimiluminescência (Supersignal West Pico - Pierce, Rockford, IL, USA). As membranas foram deblotadas e recuperadas em tampão contendo 100 mM de 20-mercaptoetanol, 2% de dodecil sulfato de sódio e 62.5 mM de Tris-HCl (pH 6.8), durante 30 minutos a 50 °C. Para determinar a equivalência entre as proteínas separadas e as transferidas, as membranas foram lavadas com TBS-T antes do bloqueio das ligações inespecíficas e a incubação com o anticorpo primário monoclonal anti- α 1-tubulina (1:5,000, Sigma-Aldrich, em BSA 5%) overnight a 4 °C. A intensidade das bandas identificadas foi quantificada usando um sistema de análise de imagem (Molecular Imaging Systems, Eastman Kodak Company, Rochester, NY). Os dados foram corrigidos com as bandas correspondentes marcadas com α 1-tubulina e são apresentados como a porcentagem entre proteína alvo e a α 1-tubulina correspondente ao grupo controle (tratado com salina- Eutermia), que representou o 100%.

2.10 Dosagem de citocinas plasmáticas

As amostras de plasma foram diluídas em água ultrapura (1:4) e as citocinas foram quantificadas usando um kit baseado em esferas magnéticas de 6.5 μ m (Bio-Plex Pro Rat Cytokine Th1/Th2 12-Plex Immunoassay - Biorad, Luminex technology, CA, USA). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante e o leitor Luminex permitiu identificar esferas de laser, as quais emitem cores diferentes que se correspondem com cada citocina. Os dados foram analisados usando o software Bio-Plex Manager 4.0 (Bio-Rad, Hercules, CA). A concentração plasmática de cada citocina foi calculada usando uma curva padrão providenciada pelo fabricante.

2.11 Protocolos experimentais

2.11.1 Experimento 1

Efeito da microinjeção icv de AOA na T_b de ratos eutérmicos. Para examinar o efeito putativo central da inibição da CBS na T_b durante a eutermia, os ratos foram microinjetados com AOA (100 pmol/1 μ l) ou solução salina (1 μ l) no 3V e injetados ip com solução salina (1 ml/kg). A T_b foi registada durante 240 minutos, começando 60 minutos antes dos tratamentos. A administração ip de LPS foi seguida imediatamente pela microinjeção icv de AOA.

2.11.2 Experimento 2

Efeito da microinjeção icv de AOA na T_b durante o choque endotoxêmico induzido por LPS. Para testar os efeitos centrais da inibição da CBS após a administração de LPS (2,5 mg/kg, 1 ml/kg), AOA (100 pmol/1 μ l) ou solução salina (1 μ l) foram microinjetados no 3V. A T_b foi registada durante 240 minutos, começando 60 minutos antes dos tratamentos.

2.11.3 Experimento 3

Análises ex-vivo da AVPO e do plasma. Na AVPO de ratos eutérmicos, hipotérmicos e febris foram determinados: a taxa de produção de H_2S , os níveis de PGD_2 e a expressão relativa das proteínas CBS, p-Akt e p-CREB. Além disso, o plasma destes animais foi também analisado para determinar a concentração de PGD_2 e de citocinas anti-inflamatórias e pro-inflamatórias. Os ratos receberam uma injeção ip de LPS (2,5 mg/kg, 1 ml/kg) ou solução salina (1 ml/kg), assim como microinjeção icv de AOA (100 pmol/1 μ l) ou solução salina (1 μ l). Os ratos hipotérmicos foram decapitados 85 minutos após o tratamento, enquanto os animais eutérmicos e febris foram decapitados após 180 minutos da administração das drogas.

2.12 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. A T_b basal (T_{bi}) foi determinada calculando a média dos valores de T_b registados durante os primeiros 60 minutos. Foi também calculada a área sob a curva durante a eutermia, a hipotermia e a febre, considerando uma quantidade igual de valores de T_b para cada fase. O baseline foi definido em 35 °C e o índice térmico é expresso em °C x minuto. Para avaliar as diferenças estatísticas

entre os grupos tratados icv com AOA ou solução salina, foi utilizado o teste t não pareado. A análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de Tukey ou Bonferroni (segundo o caso) foi usada para avaliar as diferenças estatísticas entre os grupos dos protocolos de medição das outras variáveis. O nível de significância considerado foi de $P < 0.05$.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito da administração da AOA na T_b durante eutermia

Antes de investigar o efeito da AOA sobre as respostas termorregulatórias ao choque endotoxêmico, o objetivo foi avaliar se a inibição da CBS exerce alguma influencia durante a eutermia. Como esperado, a microinjeção icv de AOA (100 pmol/1 μ l) não causou nenhuma alteração nos valores da T_b quando comparado com o grupo tratado com solução salina ($P > 0,05$; Fig. 1).

Figura 1 - Efeito do AOA na T_b durante a eutermia

Decurso temporal mostrando o efeito da microinjecção icv de AOA (100 pmol/1 μ l) ou veículo (solução salina/1 μ l) na T_b de ratos eutérmicos (injetados ip com solução salina). A seta indica o momento da administração icv e ip das drogas. Símbolos representam o valor médio de cada grupo a cada 5 minutos. O número de animais em cada grupo esta entre parêntesis.

3.2 Efeito da administração do AOA nas fases de hipotermia e febre do choque endotoxêmico

A administração de LPS (2,5 mg/kg) em ratos expostos a 25 $^{\circ}$ C causou a diminuição típica da T_b (hipotermia) nos primeiros 85 min, seguida pelo aumento da T_b até o final do período experimental. Quando o tratamento ip com LPS foi combinado com a administração icv de AOA houve uma atenuação na queda da T_b durante a fase de hipotermia ($P=0,0192$;

IC 95%: -64,56 até -1,892; AOA: $132,8 \pm 11,6$ °C x min, n=8; Salina: $90,88 \pm 10,79$ °C min, n=8; Fig 2B) e uma febre exacerbada ($P > 0, 05$; AOA: $178,8 \pm 14,53$ °C x min, n=8; Salina: $151,8 \pm 12,3$ °C x min, n=48; Fig. 2A). A T_b basal (eutermia) dos grupos salina e AOA antes da microinjeção icv e a injeção ip são mostrados na figura 2B (Índice térmico, Salina: $138,4 \pm 9,162$ °C x min, n=8; AOA: $139,1 \pm 11,5$ °C min, n=8).

Figura 2 - Efeito da AOA na T_b durante o choque endotoxêmico

A: Decurso temporal mostrando o efeito da microinjeção icv de AOA (100 pmol/1 ul) ou veículo (solução salina /1 ul) na hipotermia e a febre induzidas por LPS (2,5 mg/kg, ip). A seta indica o momento da administração icv e ip das drogas. B: Thermal index - índice térmico (área sob a curva indicada no painel A pelas linhas horizontais) calculado em ratos eutérmicos, hipotérmicos e febris. O número de animais em cada grupo esta entre parêntesis. * $P < 0, 05$ vs grupo hipotermia salina.

3.3 Taxa de produção de H₂S na AVPO

Foram dosados os níveis de H₂S na AVPO de ratos eutérmicos, hipotérmicos e febris que não foram manipulados farmacologicamente icv. A injeção ip de LPS induziu um aumento na taxa de produção de H₂S na AVPO na fase hipotermia quando comparado com eutermia e febre ($P=0,025$; IC 95%: -0,855 até -0,054; Hipotermia: $1,269 \pm 0,172$ ug/mg de proteína/h, $n=6$; Eutermia: $0,814 \pm 0,052$ $\mu\text{g/mg}$ de proteína/h, $n=6$; Febre: $0,919 \pm 0,059$ $\mu\text{g/mg}$ de proteína/h, $n=6$; Fig. 3A).

Figura 3 - Taxa de produção de H₂S na AVPO

A: Taxa de produção de H₂S na AVPO de animais eutérmicos (solução salina: 1 ml/kg, ip), hipotérmicos e febris (LPS: 2,5 mg/kg, ip). * $P < 0,05$ vs grupo eutermia. B: Desenho esquemático correspondente à região onde a AVPO está localizada e onde as amostras foram obtidas (Pontos de referência: ac, comissura anterior; 3V, terceiro ventrículo; vx, quiasma óptico). C: Foto representativa do punch na AVPO.

3.4. Efeito da administração de AOA, na produção de PGD₂ na AVPO de animais eutérmicos e animais em choque endotóxico

Em ratos eutérmicos, a microinjeção icv de AOA não causou nenhuma alteração na produção de PGD₂ ($P > 0,05$, Salina: $0,285 \pm 0,050$ pg/mg de proteína, $n=6$; AOA: $0,268 \pm 0,046$ pg/mg de proteína, $n=6$, Fig. 4). Surpreendentemente, o tratamento icv com AOA causou um aumento nos níveis de PGD₂ na AVPO de ratos hipotérmicos ($P=0,01$; $0,435 \pm 0,044$ pg/mg de proteína, $n=6$) quando comparado com ratos febris ($0,423 \pm 0,044$ pg/mg de

proteína, n=6) e com os ratos tratados icv com solução salina ($0,244 \pm 0,022$ pg/mg de proteína, n=6 e $0,321 \pm 0,013$ pg/mg de proteína, n=6, Fig. 4).

Figura 4 - Efeito da AOA na produção PGD_2 na AVPO de ratos eutérmicos, hipotérmicos e febris

O número de animais em cada grupo esta entre parêntesis. ** $P < 0,01$ vs grupos eutermia e salina hipotermia.

3.5 Efeito da administração de AOA, na produção de PGD_2 no plasma de animais eutérmicos e animais em choque endotoxêmico

Como esperado, a microinjeção de AOA não causou nenhuma alteração nos níveis plasmáticos de PGD_2 durante a eutermia ($8,433 \pm 1,939$ pg/ml, n=6), a hipotermia ($11,667 \pm 1,686$ pg/ml, n=6) ou a febre ($10,233 \pm 1,604$ pg/ml, n=6; Fig. 5). Em relação aos animais microinjetados icv com salina, foi observado um aumento nos níveis de PGD_2 no plasma de ratos hipotérmicos ($P < 0,05$; $14,233 \pm 1,962$ pg/ml, n=6) e febris ($12,700 \pm 2,155$ pg/ml, n=6), quando comparado com ratos eutérmicos ($7,683 \pm 1,480$ pg/ml, n=6).

Figura 5 - Efeito do AOA na produção de PGD₂ no plasma de ratos eutérmicos, hipotérmicos e febris

O número de animais em cada grupo esta entre parêntesis. *P < 0., 05 vs grupos eutermia.

3.6 Expressão relativa da enzima CBS na AVPO de animais eutérmicos e animais em choque endotoxêmico

Para estudar mais detalhadamente a influencia da produção do H₂S nas fases termorregulatórias do choque endotoxêmico, foi investigada a expressão relativa da enzima CBS na AVPO de animais eutérmicos, hipotérmicos e febris. Em ratos febris foi observada uma diminuição significativa na expressão relativa da CBS (P= 0, 01; 95% CI: 5,65 – 81,54; 68,86 ± 9,67 % do grupo controle; n=5. Fig. 6) quando comparado com a expressão relativa basal (eutermia: 112,46 ± 13,43 % do controle; n=6). Em animais hipotérmicos foi também observada uma tendência à diminuição na expressão relativa desta enzima na AVPO (78,98 ± 4,43 % do controle; n=7).

Figura 6 - Expressão relativa da CBS na AVPO de animais eutérmicos, hipotérmicos e febris que não receberam microinjeção icv

Em cada figura as bandas superiores representam marcação com o anticorpo primário e as bandas inferiores correspondem ao controle marcado com anti- α 1-tubulina. * $P < 0,05$ vs grupo eutermia.

3.7 Efeito da administração de AOA na AVPO, na expressão relativa das proteínas p-Akt e p-CREB de animais eutérmicos e animais em choque endotoxêmico

Houve um aumento significativo na expressão relativa de p-Akt em animais hipotérmicos tratados com AOA ($P = 0,0376$; $259,31 \pm 32,57$ % do grupo controle; Fig. 7A) quando comparado com os animais hipotérmicos microinjetados icv com salina ($99,50 \pm 31,82$ % do controle) e animais eutérmicos (Salina: $100,00 \pm 41,36$ % do controle; AOA: $118,81 \pm 27,95$ % do controle). A expressão relativa de p-Akt esteve significativamente diminuída em ratos febris microinjetados icv com AOA ($65,22 \pm 16,80$ % do controle) quando comparado com ratos febris tratados icv com salina ($231,62 \pm 97,32$ % do controle). O envolvimento do H_2S nesta via de sinalização também foi avaliado quantificando a expressão relativa de p-CREB. Em coincidência com os resultados da p-Akt, a expressão relativa de p-CREB esteve significativamente aumentada em animais hipotérmicos tratados icv com AOA ($P = 0,0462$; $269,52 \pm 22,59$ % do controle; Fig. 7B) quando comparado com

animais hipotérmicos microinjetados icv salina ($53,09 \pm 20,74$ % do controle), animais eutérmicos (Salina: $115,68 \pm 51,83$ % do controle; AOA: $126,19 \pm 54,25$ % do controle) e animais febris (Salina: $156,23 \pm 36,33$ % do controle; AOA: $104,28 \pm 48,92$ % do controle).

Figura 7 - Efeito do AOA na expressão relativa de p-Akt (A) e p-CREB (B) na AVPO de animais eutérmicos, hipotérmicos e febris

Em cada figura as bandas superiores representam marcação com o anticorpo primário e as bandas inferiores correspondem ao controle marcado com anti- $\alpha 1$ -tubulina. * $P < 0,05$.

3.8 Efeito da administração de AOA na AVPO, na produção de citocinas plasmáticas de animais eutérmicos e animais em choque endotoxêmico

Finalmente, considerando a importância das citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias na origem e manutenção da febre e a hipotermia durante o choque endotoxêmico, foi investigado se as variações nos níveis endógenos do H₂S central modulam a produção de citocinas plasmáticas. Foram quantificadas as seguintes citocinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, GM-CSF, IFN- γ e TNF- α . As citocinas que revelaram diferenças estatísticas foram: IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α , IFN γ e IL-4 (Fig. 8). Como esperado, a administração de LPS (2.5 mg/kg) induziu um aumento significativo dos níveis plasmáticos da IL-1 β durante a hipotermia ($P < 0,0001$; Salina: $26,89 \pm 7,96$ pg/ml; AOA: $36,48 \pm 11,15$ pg/ml) e a febre (Salina: $63,97 \pm 8,84$ pg / ml; AOA: $73,13 \pm 9,07$ pg/ml) quando comparado com a eutermia (Salina: $3,35 \pm 0,32$ pg/ml; AOA: $3,42 \pm 0,63$ pg/ml). Na fase de febre, os animais microinjetados icv com AOA mostraram um aumento significativo da IL-1 β quando comparado aos animais febris microinjetados icv com salina (Fig. 8A).

As análises de IL-6 também revelaram um aumento progressivo nos seus níveis plasmáticos durante a hipotermia (Salina: $315,22 \pm 55,12$ pg/ml; AOA: $817,94 \pm 270,73$ pg/ml) e a febre (Salina: $1459,74 \pm 264,96$ pg/ml; AOA: $2717,62 \pm 298,81$ pg/ml), quando comparado com a eutermia (Salina: $1,24 \pm 0,24$ pg/ml; AOA: $2,03 \pm 0,26$ pg/ml). Os níveis de IL-6 também estiveram significativamente ($P < 0,0001$) aumentados nos animais febris tratados com AOA, quando comparado com animais febris microinjetados com salina (Fig. 8B).

Os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 estiveram significativamente aumentados durante a hipotermia ($P < 0,0001$; Salina: $302,87 \pm 65,00$ pg/ml; AOA: $209,56 \pm 40,80$ pg/ml) e a febre (Salina: $111,69 \pm 15,40$ pg/ml; AOA: $111,20 \pm 22,13$ pg/ml), quando comparados com a eutermia (Salina: $14,89 \pm 3,04$ pg/ml; AOA: $10,88 \pm 2,92$ pg/ml). Porém, na fase de febre, os níveis desta citocina estiveram significativamente diminuídos quando comparado com os animais hipotérmicos. O AOA causou uma diminuição significativa na produção de IL-10 em ratos hipotérmicos, quando comparado com ratos hipotérmicos tratados icv com salina (Fig. 8C).

Os níveis do TNF α , estiveram aumentados significativamente durante a hipotermia ($P = 0,0016$; Salina: $46976,75 \pm 13466,89$ pg/ml; AOA: $11960,84 \pm 6546,74$ pg/ml) e a febre

(Salina: $151,93 \pm 59,87$ pg/ml; AOA: $200,70 \pm 47,30$ pg/ml), quando comparado com a eutermia (Salina: $6,43 \pm 0,63$ pg/ml; AOA: $6,64 \pm 0,48$ pg/ml). Nos animais hipotérmicos houve uma diminuição significativa nos níveis do $\text{TNF}\alpha$, quando comparado com os animais na fase de febre. A administração icv de AOA diminuiu significativamente o $\text{TNF}\alpha$ durante a hipotermia, quando comparado com os animais hipotérmicos microinjetados icv com salina (Fig. 8D).

Os níveis do $\text{IFN}\gamma$ estiveram significativamente aumentados durante a fase de febre ($P < 0,0001$; Salina: $29,09 \pm 4,12$ pg/ml; AOA: $57,70 \pm 10,07$ pg/ml), quando comparado com a fases de hipotermia (Salina: $9,53 \pm 0,64$ pg/ml; AOA: $8,91 \pm 0,63$ pg/ml) e eutermia (Salina: $7,95 \pm 0,80$ pg/ml; AOA: $8,14 \pm 0,64$ pg/ml). Surpreendentemente, os animais febris microinjetados icv com AOA tiveram um aumento significativo nos níveis de $\text{IFN}\gamma$, quando comparado com animais febris microinjetados icv com salina (Fig. 8E).

Finalmente, os níveis da IL-4 mostraram um aumento significativo nos animais febris tratados icv com salina ($P=0,0146$; $5,47 \pm 0,74$ pg/ml), quando comparado com os animais febris tratados icv com AOA ($3,34 \pm 0,35$ pg/ml), com os animais hipotérmicos (Salina: $3,63 \pm 0,39$ pg/ml; AOA: $3,17 \pm 0,42$ pg/ml) e com os animais eutérmicos (Salina: $3,03 \pm 0,48$ pg/ml; AOA: $3,34 \pm 0,48$ pg/ml; Fig. 8F).

Figura 8 - Efeito do AOA na produção de citocinas plasmáticas em animais eutérmicos, hipotérmicos e febris

O número de animais em cada grupo esta entre parêntesis. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ vs. Salina-Eutermia e AOA-Eutermia; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$ vs. Salina-Hipotermia; @ $p < 0,05$, @@ $p < 0,001$ vs. AOA-Hipotermia; ρ : $p < 0,05$, $\rho\rho$: $p < 0,01$, $\rho\rho\rho$: $p < 0,0001$ vs. Salina-Febre.

4 DISCUSSÃO

Este estudo fornece evidências de que o H₂S é um modulador chave das respostas termorregulatórias que ocorrem no choque endotoxêmico. Os dados indicam que este neurotransmissor gasoso desempenha um papel criogênico na fase de hipotermia e exerce uma função relativamente menor na fase de febre, ambas induzidas por dose alta de LPS (Figura 2). Esta noção foi confirmada pelo fato de que a taxa de produção de H₂S na AVPO esteve aumentada durante a fase de hipotermia, enquanto que a sua síntese em ratos febris foi mantida constante (Figura 3). Surpreendentemente, a redução na síntese de H₂S induzida pelo AOA, produziu um aumento notável nos níveis de PGD₂ na AVPO de ratos hipotérmicos, indicando que o H₂S pode de alguma forma modular a produção deste prostanoide nesta região termorreguladora do hipotálamo. Este efeito do AOA sobre a produção de PGD₂ na AVPO parece ser específico porque o mesmo tratamento não causou nenhuma alteração significativa nos níveis plasmáticos desta prostaglandina em ratos eutérmicos, hipotérmicos e febris (Figura 5). Além disso, foi demonstrado que a função criogênica do H₂S central está relacionada com um mecanismo de regulação negativa de proteínas fosforiladas da via de sinalização celular PI3K (p-Akt e p-CREB, Figura 7), cuja ativação na AVPO parece ser diretamente proporcional aos níveis plasmáticos de IL-4 (Figura 8).

Neste estudo houve limitações relacionadas com a temperatura ambiente (T_a) e com a correlação entre a produção de H₂S e PGD₂ na AVPO. A T_a de 25 °C foi determinada para a realização dos experimentos porque nesta T_a ambas as respostas termorreguladoras do choque endotoxêmico por LPS, hipotermia e febre, são observadas. Neste modelo, esta T_a favoreceu a fase de hipotermia sobre a febre (Figura 2), uma vez que é uma temperatura sub-neutra (STEINER et al., 2009). Provavelmente, diferenças estatísticas teriam sido observadas durante a fase de febre se os experimentos fossem executados a uma T_a mais alta. É tentador especular que existe uma correlação entre os níveis de H₂S e a PGD₂ na AVPO. No entanto, mais estudos são necessários para abordar esta questão específica. Limitações metodológicas impediram avaliar esta correlação porque os métodos de processamento do tecido para cada ensaio são diferentes e a quantidade de tecido obtida no punch não é grande o suficiente para executar dois ensaios utilizando o mesmo rato. Por outro lado, o tamanho reduzido da amostra é interessante devido à especificidade do local (Figura 3). No entanto, os dados obtidos são consistentes com a noção de que o H₂S modula negativamente a produção de PGD₂ na AVPO (Figura 4) e que este efeito não é observado periféricamente (Figura 5).

Os dados obtidos confirmam que o H₂S central atua na AVPO como uma molécula anti-inflamatória e antipirética, desde que a administração central de AOA bloqueou a queda de T_b durante a hipotermia e potencializou a febre neste modelo de choque endotoxêmico (Figura 2). Estes dados são consistentes com resultados de estudos anteriores que investigaram os efeitos do mesmo fármaco combinado com diferentes estímulos, tais como a exposição à hipóxia (no qual o AOA atenuou a hipotermia induzida por hipóxia (KWIATKOSKI et al., 2012)) e o desafio imunológico com dose baixa de LPS, ou seja, uma dose para produzir só febre (onde o AOA potenciou a febre induzida pelo LPS (KWIATKOSKI et al., 2013a)). A hipóxia é conhecida por aumentar a atividade dos neurónios sensíveis ao calor na AVPO (TAMAKI; NAKAYAMA, 1987) que parecem ser diferentes dos quimiorreceptores periféricos cuja estimulação é desencadeada pela queda na pressão parcial do oxigénio arterial. Por outro lado, doses baixas de LPS estimulam a liberação de citocinas pelos macrófagos periféricos que são conhecidas por provocar uma diminuição na atividade dos neurónios sensíveis ao calor na AVPO, o que resulta em aumentos da T_b (febre) (BLATTEIS, 2006). Curiosamente, a hipóxia induz um aumento na produção de H₂S na AVPO (KWIATKOSKI et al., 2012), ao passo que doses baixas de LPS reduzem a formação de H₂S nesta região hipotalâmica (KWIATKOSKI et al., 2013). Portanto, parece que o H₂S desempenha um papel fundamental como mediador 'proximal' das respostas termorregulatórias que são integradas na área pré-óptica do hipotálamo decorrente de outro tipo de estímulos que desencadeiam mecanismos completamente diferentes.

Este estudo revelou que os níveis de PGD₂ não estão alterados na AVPO de ratos hipotérmicos e febris (Figura 4). Por outro lado, foi observado um aumento nos níveis plasmáticos de PGD₂ (Figura 5) após a administração de LPS (2,5 mg/kg, i.p.). Curiosamente, um estudo recente mostrou que os níveis de PGD₂ estão aumentados no plasma durante a hipotermia induzida por LPS (KRALL et al., 2010). Por outro lado, Ueno et al. (1982) relataram que a administração ip de LPS induz um aumento na produção de PGD₂ na área pré-óptica do hipotálamo. De acordo com os dados existentes, parece plausível sugerir que este aumento na produção da PGD₂ tem lugar nas regiões vizinhas da AVPO, mas não especificamente nesta região, que faz parte desta área hipotalâmica.

O H₂S não é o único neuromodulador gasoso que participa no controle da T_b atuando na AVPO, a qual é o principal centro integrador para a termorregulação (BLATTEIS, 2006). Estudos relatam que a AVPO é uma região extremamente sensível envolvida nas fases termorregulatórias de hipotermia (BARROS et al., 2004; BARROS et al., 2006;

GARGAGLIONE et al., 2005; STEINER; BRANCO, 2002; STEINER et al., 2002b; STEINER; BRANCO, 2003) e febre (BLATTEIS, 2006; KWIATKOSKI et al., 2013). De acordo com este conceito, um estudo prévio sugeriu que o óxido nítrico (NO) na AVPO também está envolvido nas respostas termorregulatórias durante condições de hipóxia (STEINER et al., 2002b). De fato, foi proposto um modelo de termorregulação no qual moléculas tais como os neurotransmissores gasosos afetam a AVPO causando aumento ou diminuição da T_b (STEINER et al., 2002a). Considerando que a produção de prostaglandinas, especialmente nos neurónios hipotalâmicos (PISTRITTO et al., 1998; PISTRITTO et al., 1999), é conhecida porque altera os valores da T_b , é razoável sugerir que a produção de H_2S influencia a atividade da ciclooxigenase. Por conseguinte, a relação entre as respostas termorregulatórias de hipotermia e febre que ocorrem durante o choque endotoxêmico induzido por altas doses de LPS e a produção de prostaglandinas (PGs) foi avaliada (Figuras 4 e 5). As PGs foram dosadas de amostras da AVPO coletadas no momento correspondente ao nadir da hipotermia e ao pico/platô da febre (respectivamente, 85 e 180 minutos após a administração de LPS). Os resultados mostram que a produção de PGD_2 está aumentada durante a hipotermia, bem como na febre na AVPO de ratos microinjectados com AOA, sugerindo que o H_2S exerce um papel crítico na regulação da produção deste prostanóide nesta região pré-óptica e consequentemente influencia o controle de T_b durante desafios de termorregulação, dado que a PGD_2 induz um efeito hipotérmico em ratos (KANDASAMY; HUNT, 1990; KRALL et al., 2010; UENO et al., 1982). O fato de que a PGD_2 permaneceu aumentada ainda durante a fase de febre indica que este prostanóide pode estabelecer um equilíbrio entre a hipotermia e a febre como descrito por Steiner et al. (2005; 2006).

Uma vez observada a modulação negativa do H_2S sobre a produção de PGD_2 , foi analisada a expressão relativa da enzima produtora deste gás no SNC para esclarecer a dinâmica da sua produção e liberação durante o choque endotoxêmico. Os resultados evidenciaram uma diminuição progressiva na expressão relativa da enzima CBS, significativa na fase de febre (Figura 6) e condizente com a diminuição na taxa de produção de H_2S na AVPO durante a febre induzida pela dose baixa de LPS (KWIATKOSKI et al., 2013). Este estudo revelou um aumento nos níveis de H_2S na AVPO de animais hipotérmicos (Figura 3), o que sugere uma relação inversa entre os níveis de H_2S e os valores da T_b nas fases termorregulatórias do choque endotoxêmico. Porém, o aumento nos níveis deste gasotransmissor durante a hipotermia não só é resultado do aumento da expressão da CBS, mas também pode ser consequência da liberação do H_2S desde proteínas na forma de sulfuro

sulfano (uma molécula intracelular de armazenamento de H₂S (ISHIGAMI et al., 2009)) ou de ácido-débil, eventos que ocorrem em condições de acidose (OGASAWARA et al., 1994) como a inflamação sistêmica.

Os resultados deste estudo sugerem que o possível mecanismo molecular responsável pela função anti-inflamatória e anti-pirética do H₂S está relacionado com uma alteração no perfil de expressão de proteínas da via PI3K na AVPO (p-Akt e p-CREB, Figura 7). Esta via de sinalização está bem descrita em neurônios e parece que suprime a inflamação relacionada ao estresse oxidativo durante a endotoxemia (NOSHITA et al., 2002; ZHONG et al., 2016; ZHOU et al., 2008). Animais febris tratados icv com solução salina tiveram um aumento na expressão destas proteínas em neurônios termorregulatórios, indicando uma ativação de mecanismos intracelulares neuroprotetores perante o desafio imune. Apesar dos efeitos benéficos da febre, o aumento persistente da T_b pode prejudicar o prognóstico da sepse. Assim, a ativação da via PI3K poderia estar ocorrendo neste modelo para suprimir respostas exacerbadas relacionadas com a liberação de citocinas plasmáticas e aumentar a taxa de sobrevivência ao choque séptico (WILLIAMS et al., 2004). Surpreendentemente, a inibição da produção de H₂S na AVPO de animais febris também modulou negativamente a via PI3K em, já que o tratamento icv com AOA provocou uma diminuição na expressão relativa de p-Akt. Há evidência de que o H₂S modula a atividade de Akt no sistema nervoso central durante o acidente vascular cerebral isquêmico (WEN et al., 2014) e sob condições de hipóxia (SHAO et al., 2011). Esta correlação entre os níveis de H₂S e o perfil de expressão de Akt também foi descrita em cultura de osteoblastos (YAN et al., 2017) e durante a regeneração de discos intervertebrais (XU et al., 2017). Curiosamente, Szabo (2017) mostrou que a ativação da via de sinalização PI3K/Akt no endotélio pelo H₂S é um mecanismo para potenciar os efeitos do NO. Aumentando a complexidade destes mecanismos celulares, também tem sido documentada uma relação inversa entre a produção de H₂S e a expressão da p-Akt (LIU et al., 2016), que neste estudo foi observada na AVPO de ratos hipotérmicos (figura 7A). Com tudo, os resultados sugerem que durante a fase de febre no choque endotoxêmico ocorre uma diminuição na expressão da via de sinalização PI3K na AVPO que poderia ser consequência da diminuição na produção de H₂S pela enzima CBS.

Durante a endotoxemia atuam múltiplos fatores que desencadeiam uma resposta complexa e integrada (resposta de fase aguda). Entre eles, a sinalização febrigênica sistêmica desempenha um papel fundamental, e o papel de algumas citocinas na sua origem e manutenção está bem documentado. Porém, a função destes mediadores periféricos na

patogênese do choque séptico é contraditória (REMICK et al., 1995). Considerando que o H₂S modula a produção de prostanoídes no hipotálamo e com o objetivo de identificar os mecanismos sistêmicos controlados por estes eventos centrais, foram dosadas as principais citocinas plasmáticas. Há relatos de que doses baixas de LPS induzem febre porque estimulam a liberação de citocinas pelos macrófagos periféricos que diminuem a atividade dos neurónios sensíveis ao calor (BLATTEIS, 2006). Como esperado, no choque endotoxêmico induzido por dose alta de LPS os animais hipotérmicos microinjetados icv com solução salina tiveram um aumento significativo nos níveis das citocinas pro-inflamatórias IL-1 β , IL-6, e TNF α , enquanto os animais febris, além das citocinas mencionadas apresentaram um aumento nos níveis de IFN γ e a IL-4 (Figura 8). Surpreendentemente, houve um aumento das citocinas pro-inflamatórias IL-1 β , IL- 6, IFN γ e a controversa IL-4 nos animais febris microinjetados com AOA, confirmando a função anti-inflamatória e antipirética do H₂S. Curiosamente, os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 e o TNF α mostraram um perfil semelhante caracterizado pelo aumento durante a hipotermia e uma diminuição durante a fase de febre. Recentemente, foi documentado que doadores de H₂S inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias (SPRAGUE; KHALIL, 2009; WHITEMAN et al., 2010). O TNF α tem sido descrito como necessário e suficiente para o início da inflamação, fato esperado na fase de hipotermia. A ativação do reflexo inflamatório (TRACEY, 2002) poderia neste modelo ser responsável pelo aumento da IL-10 na hipotermia para regular os efeitos pro-inflamatórios do TNF α e também da diminuição deste mediador na fase de febre. É interessante que a inibição do H₂S diminuiu ambas as citocinas durante a hipotermia, sem alterar significativamente seus níveis na fase de febre. Esta diminuição da IL-10 também confirmaria a função anti-inflamatória do H₂S, enquanto no caso do TNF α poderia sugerir um mecanismo contra regulatório na ausência deste gás.

O perfil de expressão das proteínas CBS, p-akt e CREB na AVPO na fase de febre indicam que durante a inibição da produção do H₂S ocorre um aumento na expressão da via PI3K que por sua vez aumenta a liberação periférica de citocinas. De acordo com os resultados deste estudo, evidências mostram que durante a sepse induzida com LPS o aumento na expressão da via PI3K/Akt, estimula a expressão do NF- κ B incrementando os níveis de citocinas pro inflamatórias (CIANCIULLI et al., 2016; MAO et al., 2014; ZHONG et al., 2016). Em contraste, a fase de hipotermia na qual houve um aumento na expressão relativa da Akt, esteve também caracterizada pelo aumento nos níveis destas citocinas. Segundo Williams et al. (2006) a via PI3K/Akt é um mecanismo de feedback negativo ou

compensatório das respostas inflamatórias ao choque séptico. Parece que a função anti-inflamatória desta via durante o desafio imune provocado por LPS (KIDD et al., 2008; WILLIAMS et al., 2004; FUKAO; KOYASU, 2003) está relacionada com a diminuição na expressão do NF- κ B (ZHANG et al., 2016; GUHA; MACKMAN, 2002) e dos níveis de TNF α e IL-1 β (AN et al., 2016; HAN et al., 2016). A diferença entre os níveis da IL-10 nas fases de hipotermia e febre revelou neste estudo uma modulação oposta da via PI3K/Akt sobre a inflamação sistêmica. Embora Zheng et al. (2013) encontraram uma relação diretamente proporcional entre a expressão de akt e os níveis plasmáticos da IL-10, porém, esta influência é variável durante a endotoxemia (MARTIN et al., 2005). Outros estudos são necessários para esclarecer os mecanismos desta função dual da via PI3K/Akt durante as fases termorregulatórias do choque endotoxêmico.

Na fase inicial da sepse, ocorre um dramático e simultâneo incremento na produção de citocinas pro e anti-inflamatórias (LI et al., 2015), cujo balance é fundamental para manter a homeostasis e melhorar o prognóstico (HOTCHKISS et al., 2003). Chama a atenção que o bloqueio da produção de H₂S durante a fase de febre provocou uma diminuição nos níveis de IL-4, concomitantemente com a diminuição na expressão relativa da Akt. A IL-4 é uma citocina pleiotrópica secretada principalmente pelos linfócitos Th2, eosinófilos e mastócitos (GU et al., 2011), que pode exercer efeitos pro ou anti-inflamatórios (SAHOO et al., 2016). Aumentos desta citocina têm sido descritos em patologias como choque séptico (LI et al., 2015), asma alérgica, rinite, dermatites atípica, anafilaxia e outras desordens alérgicas (WYNN, 2015; PALM et al., 2012; CHATILA, 2004). Em contraste, há relatos da função anti-inflamatória da IL-4 (DOOLEY et al., 2014; ORIHUELA et al., 2016), modulando a atividade dos macrófagos e suprimindo a liberação de citocinas pro-inflamatórias (TISSI et al., 2009), principalmente em doenças autoimunes (ZAMORANO et al., 2003). Durante o desafio imune a IL-4 é um potente ativador do tecido adiposo marrom (VILLAROYA et al., 2017), sugerindo que o aumento desta citocina na fase de febre por LPS tem uma função pro-inflamatória. Curiosamente, esta citocina foi a única que esteve diminuída em ratos febris tratados icv com AOA, seguindo um padrão similar ao da p-Akt. Deste modo, o efeito neuroprotetor do H₂S durante a endotoxemia parece resultar da modulação da p-Akt na AVPO e da IL-4 plasmática.

Levando em consideração que o H₂S participa da ativação de canais iônicos (KIMURA, 2015; MALIK; FERGUSON, 2016; YIN et al., 2013), de fatores de transcrição (WEI et al., 2015; KIMURA, 2014) e modifica a função das proteínas (MUSTAFA et al., 2009; TOOHEY, 2011), é provável que o mecanismo pelo qual este gasotransmissor modula

a expressão da via PI3K/akt/CREB esteja relacionado com o aumento na ativação do receptor de tirosina-kinase na membrana plasmática dos neurônios sensíveis ao calor ou uma ativação intracelular direta de Akt ou CREB.

.

5 CONCLUSÕES

Os dados deste estudo demonstram que o H₂S participa dos processos neuroquímicos responsáveis pelos ajustes da termorregulação integrados na AVPO. Durante a fase de febre no choque endotoxêmico, baixos níveis de H₂S ainda são suficientes para induzir um aumento nos níveis de PGD₂ e na expressão de Akt na AVPO, exercendo um efeito anti-inflamatório e antipirético. Da mesma forma, a produção de H₂S na AVPO parece ser a chave para controlar a IL-4 plasmática, entre outras citocinas envolvidas na inflamação sistêmica. Em conjunto, estas descobertas podem oferecer novas ideias sobre estratégias para o controle da inflamação durante a endotoxemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ABE, K; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **J Neurosci.** 16:1066-1071. 1996.
- ALBERTI, C., et al. Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 171, 461–468. 2005.
- ALMEIDA, M.C. et al. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. **Eur J Neurosci.** Jun;23(12):3359-67. 2006.
- AL-SAFFAR, H. et al. Lipopolysaccharide-induced hypothermia and hypotension are associated with inflammatory signaling that is triggered outside the brain. **Brain Behav Immun.** Feb;28:188-95. doi: 10.1016/j.bbi.2012.11.015. Epub 2012 Dec 1. 2013.
- AN, R. et al. Melatonin attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a PI3K/Akt-dependent mechanism. **Basic Res Cardiol.** Jan;111(1):8. doi: 10.1007/s00395-015-0526-1. Epub 2015 Dec 15. 2016.
- ANGUS, D.C.;VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med.** 2013 Nov 21;369(21):2063. doi: 10.1056/NEJMc1312359. 2013.
- ANGUS, D.C.; WAX, R.S. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit. Care Med.** 29, S109–S116. 2001.
- BARROS, R.C. et al. Evidence for thermoregulation by dopamine D1 and D2 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. **Brain Res.** 1030, 165–171. 2004.
- BARROS, R.C. et al. Respiratory and body temperature modulation by adenosine A1 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. **Respir. Physiol. Neurobiol.** 153, 115–125. 2006.
- BENTZER, P. et al. Advances in Sepsis Research. **Clin. Chest Med.** 36, 521–530. 2015.
- BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharm. Ther.** 111, 194–223. 2006.
- CHATILA, T.A. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. **Trends Mol Med.** Oct;10(10):493-9. 2004.
- CHOE, J. et al. Positive feedback effect of PGE₂ on cyclooxygenase-2 expression is mediated by inhibition of Akt phosphorylation in human follicular dendritic cell-like cells. **Mol Immunol.** Apr 10;87:60-66. doi: 10.1016/j.molimm.2017.04.004. [Epub ahead of print]. 2017.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

CIANCIULLI, A. et al. PI3k/Akt signalling pathway plays a crucial role in the anti-inflammatory effects of curcumin in LPS-activated microglia. **Int Immunopharmacol.** 36, 282-90. 2016.

COBB, C.A; COLE, M.P. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. **Neurobiol Dis.** 84:4-21. 2015.

DOOLEY, D. et al. Immunopharmacological intervention for successful neural stem cell therapy: New perspectives in CNS neurogenesis and repair. **Pharmacol Ther.** 141:21-31. 2014.

ENOKIDO, Y. et al. Cystathionine β -synthase, a key enzyme for homocystein metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. **FASEB J.** 19:1854-1856. 2005.

FRANCESCATO, H.D. et al. Role of endogenous hydrogen sulfide on renal damage induced by adriamycin injection. **Arch. Toxicol.** 85, 1597–1606. 2011.

FREITAS, A.E. et al. Fluoxetine modulates hippocampal cell signaling pathways implicated in neuroplasticity in olfactory bulbectomized mice. **Behav Brain Res.** 237, 176-84. 2013.

FUKAO, T; KOYASU, S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. **Trends Immunol.** 24, 358-63. 2003.

GAIESKI, D.F. et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Crit. Care Med.** 41, 1167–1174. 2013.

GARGAGLIONI, L.H. et al. Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hypothermia. **Brain Res.** 1044, 16–24. 2005.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Crit Care Med.** 30(6):1306-10. 2002.

GU, W. et al. Association of interleukin 4 -589T/C polymorphism with T(H)1 and T(H)2 bias and sepsis in Chinese major trauma patients. **J Trauma.** Dec;71(6):1583-7. doi: 10.1097/TA.0b013e3182115034. 2011.

GUHA, M; MACKMAN, N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. **J Biol Chem.** 277, 32124-32. 2002.

HAN, M.H. et al. Flavonoids Isolated from Flowers of *Lonicera japonica* Thunb. Inhibit Inflammatory Responses in BV2 Microglial Cells by Suppressing TNF- α and IL- β Through PI3K/Akt/NF- κ B Signaling Pathways. **Phytother Res.** Nov;30 (11):1824-1832. doi: 10.1002/ptr.5688. Epub 2016 Aug 18. 2016.

HOTCHKISS, R.S. et al. Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** May 27;100(11):6724-9. Epub 2003 May 7. 2003.

- ISHIGAMI, M. et al. A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. **Antioxid Redox Signal**. 11, 205-14. 2009.
- KANDASAMY, S.B; HUNT, W.A. Involvement of prostaglandins and histamine in radiation-induced temperature responses in rats. **Radiat. Res**. 121, 84–90. 1990.
- KIDD, L.B. et al. Insulin activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (Akt) pathway reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. **J Pharmacol Exp Ther**. Jul;326(1):348-53. doi: 10.1124/jpet.108.138891. Epub 2008 Apr 29. 2008.
- KIMURA, H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. **Nitric Oxide**. 41, 4–10. 2014.
- KIMURA, H. H2S2014 in Kyoto: the 3rd International conference on H2S in biology and medicine. **Nitric Oxide**. 46, 1–6. 2015.
- KIMURA H. et al. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. **Antioxid Redox Signal**. 17:45-57. 2012.
- KRALL, C.M. et al. Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D2. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**. 298, R1512–R1521. 2010.
- KWIATKOSKI, M. et al. Hydrogen sulfide as a cryogenic mediator of hypoxia-induced anapnoea. **Neuroscience**. 201, 146–156. 2012.
- KWIATKOSKI, M. et al. Hydrogen sulfide inhibits preoptic prostaglandin E2 production during endotoxemia. **Exp. Neurol**. 240, 88–95. 2013.
- LASZLO, I. et al. Sepsis: from pathophysiology to individualized patient care. **J. Immunol. Res**. 2015, 510436. 2015.
- LEE M. et al. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. **Neurobiol Aging**. 30:1523-1534. 2009.
- LI, S.X. et al. Accompanying mild hypothermia significantly improved the prognosis of septic mice than artificial mild hypothermia. **Am J Emerg Med**. Nov;33(11):1651-8. doi: 10.1016/j.ajem.2015.08.003. Epub 2015 Aug 5. 2015.
- LI, L. et al. Hydrogen Sulfide and Cell Signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 51:169-187. 2011.
- LIU, C. et al. Hydrogen Sulfide Prevents Synaptic Plasticity from VD-Induced Damage via Akt/GSK-3 β Pathway and Notch Signaling Pathway in Rats. **Mol Neurobiol**. Aug;53(6):4159-72. doi: 10.1007/s12035-015-9324-x. Epub 2015 Jul 26. 2016.
- LIU, P. et al. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. **Nature**. 508:541-545. 2014.
- LIU, E. et al. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n.

12, p. R1372-1383, 2012.

MALIK, R; FERGUSON, A.V. Hydrogen sulfide depolarizes neurons in the nucleus of the solitary tract of the rat. **Brain Res.** 1–9. 2016.

MAO, L. et al. Absence of Appl2 sensitizes endotoxin shock through activation of PI3K/Akt pathway. **Cell Biosci.** Oct 2;4(1):60. doi: 10.1186/2045-3701-4-60. 2014.

MARTIN, M. et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. **Nat Immunol.** 6, 777-84. 2005.

MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K. Central neural pathways for thermoregulation. **Frontiers in Bioscience.** v. 16, p. 74-104. 2011.

MUSTAFA, A.K. et a. H₂S signals through protein S-sulphydration. **Sci Signal.** 2, ra72. 2009.

NOSHITA, N. et al. Akt phosphorylation and neuronal survival after traumatic brain injury in mice. **Neurobiol Dis.** 9:294-304. 2002.

OGASAWARA, Y. et al. Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat. **Biol Pharm Bull.** 17, 1535-42. 1994.

ORIHUELA, R. et al. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. **Br J Pharmacol.** 173:649-65. 2016.

Palm, N.W. et al. Allergic host defences. **Nature.** Apr 25;484(7395):465-72. doi: 10.1038/nature11047. 2012.

PADIYA, R. et al. Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat. **PLoS One.** 9: e94228. 2014.

PAXINOS, G; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press.** New York, 2007.

PISTRITTO, G. et al. The relative contribution of constitutive and inducible cyclooxygenase activity to lipopolysaccharide-induced prostaglandin production by primary cultures of rat hypothalamic astrocytes. **Neurosci. Lett.** 246, 45–48. 1998.

PISTRITTO, G. et al. Bacterial lipopolysaccharide increases prostaglandin production by rat astrocytes via inducible cyclooxygenase: evidence for the involvement of nuclear factor kappaB. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 263, 570–574. 1999.

REMICK, D. et al. Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. **Shock.** 4, 89-95. 1995.

ROMANOVSKY, A.A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Front Biosci.** Sep 1;10:2193-216. Review. 2005.

ROMANOVSKY, A.A. et al. Selected contribution: ambient temperature for experiments in

rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **J Appl Physiol** (1985). Jun;92(6):2667-79. 2002.

ROMANOVSKY, A.A. et al. Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. **Am. J. Physiol.** 270, R693–R703. 1996.

RUDAYA, A.Y. et al. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 289:R1244-R1252. 2005.

SAHOO, A. et al. T helper 2 and T follicular helper cells: Regulation and function of interleukin-4. **Cytokine Growth Factor Rev.** Aug;30:29-37. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.03.011. Epub 2016 Mar 31. 2016.

SHAO, J.L. et al. H₂S protects hippocampal neurons from anoxia-reoxygenation through cAMP-mediated PI3K/Akt/p70S6K cell-survival signaling pathways. **J Mol Neurosci.** 43:453-460. 2011.

SHIMIZU, T. et al. Purification and properties of pros- taglandin D synthetase from rat brain. **J. Biol. Chem.** 254, 5222–5228. 1979.

SPRAGUE, A.H; KHALIL, R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochem Pharmacol.** 78:539-552. 2009.

STEINER, A.A. et al. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 282, R584–R593. 2002a.

STEINER, A.A. et al. A neurochemical mechanism for hypoxia-induced anapyrexia. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 283, R1412–R1422. 2002b.

STEINER, A.A. et al. Expanding the febrigenic role of cyclooxygenase-2 to the previously overlooked responses. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 289, R1253–R1257. 2005.

STEINER, A.A. et al. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. **PLoS Biol.** 4, e284. 2006.

STEINER, A.A. et al. Cyclooxygenase-1 or -2 – which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 297, R485–R494. 2009.

STEINER, A.A; BRANCO, L.G. Carbon monoxide is the heme oxygenase product with a pyretic action: evidence for a cGMP signaling pathway. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 280:R448-R457. 2001.

STEINER, A.A; BRANCO, L.G. Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. **Annu. Rev. Physiol.** 64, 263–288. 2002.

STEINER, A.A; BRANCO, L.G. Fever and anapyrexia in systemic inflammation: intracellular signaling by cyclic nucleotides. **Front. Biosci.** 8, s1398–s1408. 2003.

SZABO, C. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. **Am J Physiol Cell Physiol.** Jan 1;312(1):C3-C15. doi: 10.1152/ajpcell.00282.2016. Epub 2016 Oct 26. 2017.

TAMAKI, Y; NAKAYAMA, T. Effects of air constituents on thermosensitivities of preoptic neurons: hypoxia versus hypercapnia. **Pflug. Arch.** 409, 1–6. 1987.

TISSI, L. et al. IL-4 deficiency decreases mortality but increases severity of arthritis in experimental group B Streptococcus infection. **Mediators Inflamm.** 2009:394021. doi: 10.1155/2009/394021. Epub 2009 Jul 7. 2009.

TOOHEY, J.I. Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane? **Anal Biochem.** 413, 1-7. 2011.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature.** 420, 853-9. 2002.

UENO, R.. et al. Role of prostaglandin D2 in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79, 6093–6097. 1982.

VILLARROYA, F. et al. Brown adipose tissue as a secretory organ. **Nat Rev Endocrinol.** Jan;13(1):26-35. doi: 10.1038/nrendo.2016.136. Epub 2016 Sep 12. 2017.

WANG, Y. et al. SMND-309 promotes neuron survival through the activation of the PI3K/Akt/CREB-signalling pathway. **Pharm Biol.** 54, 1982-90. 2016.

WEI, X. et al. Hydrogen sulfide induces neuroprotection against experimental stroke in rats by down-regulation of AQP4 via activating PKC. **Brain Res.** 1622, 292–299. 2015.

WEN X. et al. H₂S attenuates cognitive deficits through Akt1/JNK3 signaling pathway in ischemic stroke. **Behav Brain Res.** 269:6-14. 2014.

WHITEMAN, M. et al. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. **Antioxid Redox Signal.** 12:1147-54. 2010.

WILLIAMS, D.L. et al. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway alters host response to sepsis, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Shock.** 25:432-439. 2006.

WILLIAMS, D.L. et al. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis. **J Immunol.** 172, 449-56. 2004.

WYNN, T.A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. **Nat Rev Immunol.** May;15(5):271-82. doi: 10.1038/nri3831. Epub 2015 Apr 17. 2015.

XU, D. et al. Hydrogen sulfide protects against endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury in nucleus pulposus cells and ameliorates intervertebral disc degeneration. **Pharmacol Res.** Mar;117:357-369. doi: 10.1016/j.phrs.2017.01.005. Epub 2017 Jan 10. 2017.

- YAN X. et al. The New Synthetic H₂S-Releasing SDSS Protects MC3T3-E1 Osteoblasts against H₂O₂-Induced Apoptosis by Suppressing Oxidative Stress, Inhibiting MAPKs, and Activating the PI3K/Akt Pathway. **Front Pharmacol.** Jan 20;8:07. doi: 10.3389/fphar.2017.00007. 2017.
- YIN, J., et al. Exogenous hydrogen sulfide protects against global cerebral ischemia/reperfusion injury via its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in rats. **Brain Res.** 1491, 188–196. 2013.
- ZAMORANO, J. et al. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activity is necessary for the activation of STAT6. **J Immunol.** Oct 15;171(8):4203-9. 2003.
- ZHANG, X. et al. Methane limit LPS-induced NF- κ B/MAPKs signal in macrophages and suppress immune response in mice by enhancing PI3K/AKT/GSK-3 β -mediated IL-10 expression. **Sci Rep.** Jul 11;6:29359. doi: 10.1038/srep29359. 2016.
- ZHENG, Y. et al. Ephedrine hydrochloride inhibits PGN-induced inflammatory responses by promoting IL-10 production and decreasing proinflammatory cytokine secretion via the PI3K/Akt/GSK3 β pathway. **Cell Mol Immunol.** Jul;10(4):330-7. doi: 10.1038/cmi.2013.3. Epub 2013 Apr 22. 2013.
- ZHONG, W. et al. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF- κ B related signaling. **Biomed Pharmacother.** 83:302-313. 2016.
- ZHOU, P. et al. Neuroprotection by PGE₂ receptor EP1 inhibition involves the PTEN/AKT pathway. **Neurobiol Dis.** 29: 543-551. 2008.
- ZOTOVA, N.V. et al. Systemic Inflammation: Methodological Approaches to Identification of the Common Pathological Process. **PLoS One.** 11:e0155138. 2016.

ANEXO A – Artigo publicado no periódico *Brain Research*

Brain Research 1650 (2016) 218–223

Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainres

Research report

Cryogenic role of central endogenous hydrogen sulfide in the rat model of endotoxic shock

Rodrigo A.R. Fernández^a, Renato N. Soriano^b, Heloísa D.C. Francescato^a, João P. Sabino^c,
Terezila M. Coimbra^a, Luiz G.S. Branco^{c,*}

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

^b Division of Physiology and Biophysics, Department of Basic Life Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 35020-220 Governador Valadares, MG, Brazil

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

ⁿ Correspondence to: 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@forp.usp.br (L.G.S. Branco).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.047>

Abstract

Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide (LPS) are affected by modulators that increase (pro-pyretic) or decrease (cryogenic) body temperature (T_b). We tested the hypothesis that central hydrogen sulfide (H₂S) acts as a thermoregulatory modulator and that H₂S production in the anteroventral preoptic region of the hypothalamus (AVPO) is increased during hypothermia and decreased during fever induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS, 2.5 mg/kg i.p.) in rats kept at an ambient temperature of 25 °C. Deep T_b was recorded before and after pharmacological inhibition of the enzyme cystathionine β-synthase (CBS – responsible for H₂S endogenous production in the brain) combined or not with LPS administration. To further investigate the mechanisms responsible for these thermoregulatory adjustments, we also measured prostaglandin D₂ (PGD₂) production in the AVPO. LPS caused typical hypothermia followed by fever. Levels of AVPO H₂S were significantly

increased during hypothermia when compared to both euthermic and febrile rats. Intracerebroventricular (icv) microinjection of aminooxyacetate (AOA, a CBS inhibitor; 100 pmol) neither affected Tb nor basal PGD2 production during euthermia. In LPS-treated rats, AOA caused increased Tb values during hypothermia, along with enhanced PGD2 production. We conclude that the gaseous messenger H₂S modulates hypothermia during endotoxic shock, acting as a cryogenic molecule.

Keywords: Fever, Hypothermia, Hypothalamus, LPS, Systemic inflammation, PGD2

1. Introduction

Sepsis is the systemic response to serious infection that manifests as a continuum of illness from mild vital sign abnormalities to multiple organ dysfunctions (Bentzer et al., 2015; Laszlo et al., 2015). The growing incidence of sepsis is associated with mortality rates of 20–50% in the USA (Gaieski et al., 2013) and despite great advances in our understanding of its pathophysiology and the use of supportive treatments in intensive care units (for instance: vasopressor agents, antibiotic treatment and fluid reposition) the morbidity and mortality rates remain inaptly high worldwide (Alberti et al., 2005; Angus and Wax, 2001). During sepsis important body temperature (Tb) changes are observed: ranging from hypothermia (an energy-conservation strategy that reduces oxygen demand) to fever (an energy-consuming strategy that slow microorganism growth and enhance host immune responses) (Krall et al., 2010). These changes are thought to be triggered by signals in the periphery and to be modulated by the brain, where the anteroventral preoptic region of the hypothalamus (AVPO) plays a major thermoregulatory role. Not only the gaseous molecule nitric oxide (Steiner et al., 2002a) but also hydrogen sulfide (H₂S) have been reported to be endogenously produced gaseous modulators (Kimura, 2015) that affects Tb regulation by acting in the AVPO, during hypoxia-induced hypothermia (Kwiatkoski et al., 2012) and fever induced by low doses of LPS (Kwiatkoski et al., 2013). However, nothing is known about the H₂S role during thermoregulatory responses to sepsis-like conditions, where Tb changes include hypothermia followed by fever (Romanovsky et al., 1996).

In 1979, PGD2 was reported to be a major PG in the brain (Shimizu et al., 1979).

Interestingly Ueno (Ueno et al., 1982) showed that PGD2 participates in the LPS-induced hypothermic phase. Moreover, in agreement with the notion that PGD2 plays a cryogenic role, Krall showed that PGD2 plays a major role in the drop in Tb induced by food deprivation (Krall et al., 2010).

Considering that in the AVPO, H₂S has been reported to induce thermoregulatory adjustments not only during hypothermia at least that induced by hypoxia (Kwiatkoski et al., 2012) but also fever induced by low doses of LPS (Kwiatkoski et al., 2013), the goal of this study was to investigate whether H₂S modulates changes in Tb (that includes both hypothermia and fever) observed during sepsis-like conditions (induced with high dose of LPS), using a pharmacological inhibitor of cystathionine β -synthase (CBS – enzyme responsible for H₂S endogenous production in the CNS). To further investigate the mechanisms responsible for these responses we measured PGD2 (known to act as a key cryogenic mediator) production in the AVPO and plasma during hypothermia and fever.

2. Results

2.1. Effect of administration of AOA on Tb during euthermia

Before investigating the effect of AOA on the thermoregulatory responses to endotoxemia, we evaluated whether the CBS inhibitor would affect Tb control during euthermia. As expected, icv microinjection of AOA (100 pmol) did not cause any significant effect on Tb when compared to the saline-treated group ($P < 0.05$; Fig. 1).

2.2. Effect of AOA on LPS-induced hypothermia and fever

The basal Tb values (euthermia) of the saline and AOA groups before microinjections and injection of LPS are shown (thermal index, Saline: 138.4 ± 9.162 °C min, $n=8$; AOA: 139.1 ± 11.54 °C min, $n=8$; Fig. 2B). LPS administration (2.5 mg/ kg) to rats exposed to 25 °C caused the typical decrease of Tb (hypothermia) in the first 90 min followed by an increase in Tb until the end of the experimental period. When LPS treatment was combined with icv administration of AOA we observed an attenuated drop in Tb during the hypothermic phase ($P=0.0192$; 95% CI: -64.56 to -1.892; AOA: 132.8 ± 11.61 °C min, $n=8$; Saline: 90.88 ± 10.79

°C min, n=8; Fig. 2B) and an increased fever ($P>0.05$; AOA: 178.8 ± 14.53 °C min, 151.8 ± 12.38 °C min, n=8; Fig. 2B).

Fig. 1. Effect of AOA on Tb during euthermia. Time courses showing the effect of icv microinjection of AOA (100 pmol/1 µl) or vehicle (saline/1 µl) on Tb of euthermic rats. Arrow indicates the moment of the icv microinjection immediately followed by ip injection. Values are means $\pm$ SEM. Number of animals in each group is shown in parenthesis.

2.3. AVPO production rate of H₂S

LPS injection induced an increased H₂S production rate in the AVPO of hypothermic rats when compared to euthermia and fever groups ($P=0.025$; 95% CI: -0.855 to -0.054; Hypothermia: 1.269 ± 0.172 µg/mg protein/h, n=6; Euthermia: 0.814 ± 0.052 µg/mg protein/h, n=6; Fever: 0.919 ± 0.059 µg/mg protein/h, n=6; Fig. 3A).

2.4. AVPO levels of PGD₂

In euthermic rats, icv microinjection of AOA did not affect PGD₂ production ($P>0.05$; Saline: 0.2855 ± 0.05033 pg/mg protein, n=6; AOA: 0.268 ± 0.046 pg/mg protein, n=6; Fig. 4). Surprisingly, AOA evoked increased levels of AVPO PGD₂ in hypothermic rats ($P=0.01$; 0.435 ± 0.044 pg/mg protein, n=6) when compared to febrile ones (0.423 ± 0.044 pg/mg protein, n=6) and the icv saline-treated groups (0.244 ± 0.022 pg/mg protein, n=6 and 0.321 ± 0.013 pg/mg protein, n=6; Fig. 4).

Fig. 2. Effect of AOA on thermoregulation during the LPS shock. A: Time courses showing the effect of icv microinjection of AOA (100 pmol/1 μ l) or vehicle (saline/ 1 μ l) on LPS-induced hypothermia and fever (2.5 mg/kg, ip). Arrow indicates the moment of the ip injection and icv microinjection. B: Thermal indexes (area under curve indicated in panel A by horizontal lines) calculated from euthermic, hypothermic and febrile rats. Values are means $\pm$ SEM. Number of animals in each group is shown in parenthesis. * $P < 0.05$ vs. control group.

Fig. 3. A: H₂S production rate in the AVPO of euthermic (saline: 1 ml/kg, ip), hypothermic and febrile rats (LPS: 2.5 mg/kg, ip). Values are means $\pm$ SEM. * P <0.05 vs. euthermia. B: Schematic drawing of the site in which samples were obtained. Schematic drawing corresponds to the region where the AVPO is located (landmarks: ac, the anterior commissure; 3 V, the third ventricle; ox, the optic chiasm). C: Representative photo of a punch in the AVPO.

Fig. 4. Effect of AOA on AVPO PGD₂ production in euthermic, hypothermic and febrile rats. Values are means $\pm$ SEM. Number of animals in each group is shown in parenthesis. ** P <0.01 vs. control groups and saline hypothermia.

2.5. Plasma levels of PGD₂

We observed increased plasma PGD₂ levels in hypothermic (14.233 ± 1.962 pg/ml, $n=6$) and febrile rats (12.700 ± 2.155 pg/ml, $n=6$) in comparison to euthermic rats ($7.683 \pm$

1.480 pg/ml, n=6). The icv microinjection of AOA (100 pmol) did not cause any significant effect on plasma PGD₂ production either during euthermia (8.433 ± 1.939 pg/ml, n=6), hypothermia (11.667 ± 1.686 pg/ml, n=6) or fever (10.233 ± 1.604 pg/ml, n=6) (Fig. 5).

Fig. 5. Effect of AOA on plasma PGD₂ production in euthermic, hypothermic and febrile rats. Values are means $\pm$ SEM. Number of animals in each group is shown in parenthesis.

3. Discussion

The present study provides robust evidence that H₂S is a key modulator of the thermoregulatory responses to endotoxic shock. Our data are consistent with the notion that H₂S plays a cryogenic role in the hypothermic phase whereas exerts a relatively minor function in the febrile phase of the LPS shock (Fig. 2). Strengthening this notion is the fact that the H₂S production rate in the AVPO was found to be increased during the LPS-induced hypothermia, whereas its synthesis in febrile rats was kept constant (Fig. 3). Interestingly, AOA-induced reduction of the H₂S formation produced a remarkable augmentation of the levels of PGD₂ in the AVPO of hypothermic rats, indicating that H₂S may somehow down modulate the synthesis of PGD₂ in this thermoregulatory region of the preoptic hypothalamus. This effect of AOA on AVPO PGD₂ production seems to be specific because the same treatment failed to cause any significant change in plasma PGD₂ levels not only in euthermic rats but also in hypothermic and febrile rats (Fig. 5).

Limitations of the present study are related to the Ta and a putative correlation

between H₂S and PGD₂ production. The rationale for using a Ta of 25 °C is based on the fact that it is well known that at this Ta both thermoregulatory responses to LPS, i.e., hypothermia and fever, are observed. Not surprisingly this Ta favored the hypothermic phase over fever (Fig. 2), since it is a sub- neutral temperature (Steiner et al., 2009). Perhaps, more distinct differences during the febrile phase would have been observed if the experiments were run at a higher Ta.

It is tempting to speculate that a correlation between H₂S and PGD₂ exists. However, further studies are needed to address this specific issue. Unfortunately, in the present study, methodological limitations precluded us from assessing a direct correlation between H₂S and PGD₂ production in the AVPO. This is so because of the tissue processing differs between methods of measurements, and also due to the fact that the amount of tissue sampled by the punch needle is not big enough to run two different assays using the same rat. On the other hand, the reduced tissue sample size is interesting because of its site specificity (Fig. 3). Nevertheless, the obtained data are consistent with the notion that H₂S is likely to down modulate PGD₂ production in the AVPO (Fig. 4) and that this effect of H₂S is not observed peripherally (Fig. 5).

We demonstrated that centrally administered AOA blunts the drop in Tb during hypothermia and potentiates fever in the rat model of endotoxic shock (Fig. 2). These data are consistent with previous reports investigating the effects of the same drug combined with different stimuli, i.e., hypoxia exposure (in which AOA attenuated the hypoxia-induced hypothermia (Kwiatkoski et al., 2012)) and immune challenge with LPS given at low doses to produce fever (in which AOA potentiated LPS-induced fever (Kwiatkoski et al., 2013)). Hypoxia is known to increase the activity of AVPO warm-sensitive neurons (Tamaki and Nakayama, 1987), which is supposed to differ from the more conventional peripheral chemoreceptors stimulation triggered by the drop in arterial oxygen partial pressure. Conversely, low doses of LPS trigger cytokines release from peripheral macrophages which is known to cause a decreased activity of AVPO warm-sensitive neurons, which results in increases in Tb (fever) (Blatteis, 2006). Interestingly, hypoxia induces an increased H₂S production rate in the preoptic hypothalamus (Kwiatkoski et al., 2012), whereas low doses of LPS reduce H₂S formation in this hypothalamic region (Kwiatkoski et al., 2013). Therefore, it seems that H₂S plays a key role as a ‘proximal’ mediator of thermoregulatory responses that are integrated in the preoptic hypothalamus arising from different sort of stimuli which

trigger entirely distinct mechanisms.

In the present study PGD2 levels were found to be unaltered in the AVPO of hypothermic and febrile rats (Fig. 4). Conversely, PGD2 levels were observed to be increased in plasma (Fig. 5) after LPS administration (2.5 mg/kg, i.p.). Interestingly, a recent report has shown that PGD2 levels are increased in plasma during the LPS- induced hypothermia (Krall et al., 2010). Ueno et al. (1982) re- ported that ip administration of LPS causes an increase in PGD2 in the preoptic/hypothalamic area. Reconciling the existing data, it seems plausible to suggest that this increased PGD2 production takes place in the neighboring regions of the AVPO but not specifically in this region which is part of the preoptic hypothalamus.

H₂S is not the only gaseous neuromodulator that participates in Tb control acting in the AVPO, the major integrative center for thermoregulation (Blatteis, 2006). The AVPO has been reported to be an extremely sensitive preoptic region involved in both hypothermia (Barros et al., 2004, 2006; Gargaglioni et al., 2005; Steiner and Branco, 2002; Steiner et al., 2002b; Steiner and Branco, 2003) and fever (Blatteis, 2006; Kwiatkoski et al., 2013). In agreement with this notion, a previous study has suggested that NO in the AVPO is involved in thermoregulatory responses during hypoxic conditions (Steiner et al., 2002b). In fact, a thermo- regulatory model has been proposed in which molecules affecting AVPO cause increases or decreases in Tb (Steiner et al., 2002a). Given the fact that the generation of prostaglandins, particularly by hypothalamic neurons (Pistritto et al., 1998, 1999), are known to alter Tb, it is reasonable to suggest that H₂S production influences cyclooxygenase activity. Accordingly, the relationship between the thermoregulatory responses to the LPS shock and PGD2 production was assessed (Fig. 4). PGD2 from samples of the AVPO was collected at the time corresponding to the nadir of hypothermia and the peak/plateau of fever (respectively, 85 and 180 min after LPS administration). PGD2 production was found to be raised during hypothermia in the AVPO of rats microinjected with AOA, suggesting that H₂S exerts a critical role in regulating PGD2 production in this preoptic region, consequently influencing the control of Tb during thermoregulatory challenges, given that PGD2 induces a hypothermic effect in rats (Kandasamy and Hunt, 1990; Krall et al., 2010; Ueno et al., 1982). PGD2 had a tendency to remain increased even during fever indicate that this prostanoid may establish a balance between hypothermia and fever as re- ported elsewhere (Steiner et al., 2005, 2006).

In summary, the present study adds H₂S as a key gasotransmitter besides nitric oxide that participates in the neurochemical process responsible for thermoregulatory adjustments that are integrated in the AVPO. Since H₂S has been reported to activate ion channels, transcription factors and tumor suppressors (Kimura, 2014, 2015; Malik and Ferguson, 2016; Wei et al., 2015; Yin et al., 2013) further studies are necessary to shed light into the mechanisms of action of this gaseous transmitter on the warm-sensitive neurons activity.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

In this study we used adult male Wistar rats obtained from institutional vivarium sources. Rats were initially group-housed (3 animals per cage). After surgeries, they were caged individually and acclimated for 1 week before experimentation. The rats were maintained in a temperature-controlled chamber at 25 °C (model: ALE 9902001; Alesco Ltda., Monte Mor, SP, Brazil) with a 12:12-h light:dark cycle (lights on at 6:00 a.m.) and free access to water and food. The rats weighed an average of 290 g (ranging from 280 to 360 g) at the time of the experiments. The Local Ethical Committee for Animal Use approved all experimental protocols (Process number: 2013.1.1414.58.0).

4.2. Surgeries

Seven days before experimentation, surgical procedures were performed under ketamine-xylazine anesthesia (100 and 10 mg/kg, respectively; 1 ml/kg, intraperitoneal, ip). Rats were implanted with an intra-abdominal temperature datalogger (for Tb measurements) through midline laparotomy. A medial laparotomy was performed so as to insert a SubCue miniature datalogger capsule (Calgary, Alberta, Canada) into the peritoneal cavity. Then the animals were fixed on a stereotaxic frame to be implanted with an stainless steel guide cannula (16-mm long, 22-gauge outer diameter) in the third ventricle (3 V) for intracerebroventricular (icv) administration of saline or Aminooxyacetate (AOA). The following stereotaxic coordinates were used: incisor bar: -3.3mm, anteroposterior: -0.4 mm, lateral: 0.0 mm, and dorsoventral: -4.5 mm from bregma. An incision was made on the skin over the sagittal suture, the periosteum was dissected and the guide cannula was fixed to the

skull acrylic cement. To maintain patency and prevent infection a tightly fitting stylet was inserted into the guide cannula. After surgical procedures antibiotic protection (160,000 U/kg benzylpenicillin, 33.3 mg/kg streptomycin, and 33.3 mg/kg dihydrostreptomycin; 1 ml/kg, intramuscular) and analgesic medication (Flunexine; 2.5 mg/kg, 1 ml/kg, sub- cutaneous) were provided.

4.3. Drugs

The *Escherichia coli* LPS (0111: B4) and Aminooxyacetate (AOA – CBS inhibitor) were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA. Drugs were dissolved in pyrogen-free saline.

4.4. Experimental protocols

Throughout the experiments, including the overnight period, the rats were kept in the experiment room at 25 °C. To perform icv microinjection, we used a 5- μ l syringe (Hamilton, Reno, NV, USA) connected to a microinjection needle (30-gauge outer diameter) with a polyethylene tube (PE 10). Both the ip and icv extensions were filled with the drugs of interest or their vehicles. Drug administration was performed on freely-moving, undisturbed rats. Microinjection needle protruded 4 mm beyond the guide cannula to reach the 3 V and was inserted into the guide cannula solely at the moment of the microinjection. Icv microinjection preceded the ip injection of LPS (2.5 mg/kg). The doses of AOA (Kwiatkoski et al., 2013) and LPS (known to activate both cryogenic and febrigenic signaling (Steiner et al., 2009)) were based on the literature. The drugs or vehicles were administered at 10:00 a.m., and the rats were left undisturbed.

4.5. Tb recordings

Temperature datalogger capsule (SubCue, Calgary, AB, Canada) inserted into the peritoneal cavity recorded Tb at 5-min intervals during 240 min of experimentation.

4.6. AVPO sampling and measurements of H₂S production rate

Rat brains were quickly excised, immediately frozen by submersion in dry ice-cold isopentane, and stored at -80°C . H₂S production rate was measured as previously reported (Donatti et al., 2014; Francescato et al., 2011; Kwiatkoski et al., 2012, 2013; Singh et al., 2009). Bilateral AVPO samples were obtained in a cryostat by a punch needle (0.9 mm inner diameter) from a 500- μm thick slice of the preoptic hypothalamus, based on the following landmarks: ventral, optic chiasm; dorsal, anterior commissure; median, the 3 V. Punches were taken just above the dorsal boundary of the optic chiasm and at the left and right lateral wall of the 3 V. AVPO samples were processed, and optical density was measured at 670 nm. The calibration curve of absorbance was obtained using Na₂S solutions (0.1–100 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

4.7. Assessment of PGD₂ concentration in the AVPO and plasma

Prostaglandin D₂ levels were assessed using enzyme immunoassay (Prostaglandin PGD₂-MOX EIA Kit; Cayman Chemical, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. Bilateral AVPO and plasma samples (diluted 1:50) were homogenized (VirTis, Gardiner, NY, USA) in EIA buffer (110 and 100 μl , respectively). The homogenates of AVPO were centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C . Resulting supernatants were used for PGD₂ and protein determination. Samples were treated with methoxylamine hydrochloride (MOX-HCL) converting PGD₂ in PGD₂-MOX (a stable MOX derivate) to prevent its chemical degradation. Samples were reconstituted in assay buffer provided in the kit and optical density was measured at 420 nm.

4.8. Experimental protocols

Experiment 1: Effect of icv microinjection of AOA on Tb of euthermic rats. To examine the putative central effect of CBS inhibition on Tb during euthermia, rats were microinjected with AOA (100 pmol/1 μl) or saline (1 μl) into the 3 V followed by an ip injection of saline (1 ml/kg). Tb was recorded for 240 min, starting 60 min before treatments.

Experiment 2: Effect of icv microinjection of AOA on LPS immune challenge. To test the central effects of CBS inhibition after LPS administration (2.5 mg/kg, 1 ml/kg), AOA (100 pmol/1 μl) or saline (1 μl) was microinjected into the 3 V. Tb was recorded for 240 min,

starting 60 min before treatments.

Experiment 3: Measurements of the AVPO levels of H₂S and plasma and AVPO levels of PGD₂. We measured H₂S production rate and PGD₂ levels in the AVPO and plasma of euthermic, hypothermic and febrile rats. Rats received an ip injection of LPS (2.5 mg/kg, 1 ml/kg) or saline (1 ml/kg). Febrile rats were decapitated at 240 min after LPS treatment, whereas hypothermic rats were decapitated at 85 min after the treatment.

4.9. Data analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Initial values of Tb (T_{bi}) was calculated by averaging Tb values recorded during the first 60 min (basal period). Area under curve was calculated adopting as baseline 35 °C (thermal index, expressed as °C min, during euthermia, hypothermia and fever). Unpaired t test was used to assess statistical differences between the AOA- and saline-treated groups. One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test was used to assess statistical differences among the groups of the H₂S measurement protocol. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test was used to assess statistical differences among the groups of the PGD₂ measurement protocol. The level of significance was set at P<0.05.

References

- Alberti, C., Brun-Buisson, C., Chevret, S., Antonelli, M., Goodman, S.V., Martin, C., Moreno, R., Ochagavia, A.R., Palazzo, M., Werdan, K., Le Gall, J.R., 2005. Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 461–468.
- Angus, D.C., Wax, R.S., 2001. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit. Care Med.* 29, S109–S116.
- Barros, R.C., Branco, L.G., Carnio, E.C., 2004. Evidence for thermoregulation by dopamine D1 and D2 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Brain Res.* 1030, 165–171.
- Barros, R.C., Branco, L.G., Carnio, E.C., 2006. Respiratory and body temperature modulation by adenosine A1 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 153, 115–125.

- Bentzer, P., Russell, J.A., Walley, K.R., 2015. Advances in Sepsis Research. *Clin. Chest Med.* 36, 521–530.
- Blatteis, C.M., 2006. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharm. Ther.* 111, 194–223.
- Donatti, A.F., Araujo, R.M., Soriano, R.N., Azevedo, L.U., Leite-Panissi, C.A., Branco, L. G., 2014. Role of hydrogen sulfide in the formalin-induced orofacial pain in rats. *Eur. J. Pharm.* 738, 49–56.
- Francescato, H.D., Marin, E.C., Cunha Fde, Q., Costa, R.S., Silva, C.G., Coimbra, T.M., 2011. Role of endogenous hydrogen sulfide on renal damage induced by adriamycin injection. *Arch. Toxicol.* 85, 1597–1606.
- Gaieski, D.F., Edwards, J.M., Kallan, M.J., Carr, B.G., 2013. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit. Care Med.* 41, 1167–1174.
- Gargaglioni, L.H., Steiner, A.A., Branco, L.G., 2005. Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hypothermia. *Brain Res.* 1044, 16–24.
- Kandasamy, S.B., Hunt, W.A., 1990. Involvement of prostaglandins and histamine in radiation-induced temperature responses in rats. *Radiat. Res.* 121, 84–90.
- Kimura, H., 2014. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* 41, 4–10.
- Kimura, H., 2015. H₂S2014 in Kyoto: the 3rd International conference on H₂S in biology and medicine. *Nitric Oxide* 46, 1–6.
- Krall, C.M., Yao, X., Hass, M.A., Feleder, C., Steiner, A.A., 2010. Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D₂. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R1512–R1521.
- Kwiatkoski, M., Soriano, R.N., Francescato, H.D., Batalhao, M.E., Coimbra, T.M., Carnio, E.C., Branco, L.G., 2012. Hydrogen sulfide as a cryogenic mediator of hypoxia-induced anapyrexia. *Neuroscience* 201, 146–156.
- Kwiatkoski, M., Soriano, R.N., Araujo, R.M., Azevedo, L.U., Batalhao, M.E., Francescato, H.D., Coimbra, T.M., Carnio, E.C., Branco, L.G., 2013. Hydrogen sulfide inhibits preoptic prostaglandin E₂ production during endotoxemia. *Exp. Neurol.* 240, 88–95.
- Laszlo, I., Trasy, D., Molnar, Z., Fazakas, J., 2015. Sepsis: from pathophysiology to individualized patient care. *J. Immunol. Res.* 2015, 510436.
- Malik, R., Ferguson, A.V., 2016. Hydrogen sulfide depolarizes neurons in the nucleus of the solitary tract of the rat. *Brain Res.*, 1–9.
- Pistritto, G., Mancuso, C., Tringali, G., Perretti, M., Preziosi, P., Navarra, P., 1998. The relative contribution of constitutive and inducible cyclooxygenase activity to lipopolysaccharide-induced prostaglandin production by primary cultures of rat hypothalamic

astrocytes. *Neurosci. Lett.* 246, 45–48.

Pistrutto, G., Franzese, O., Pozzoli, G., Mancuso, C., Tringali, G., Preziosi, P., Navarra, P., 1999. Bacterial lipopolysaccharide increases prostaglandin production by rat astrocytes via inducible cyclooxygenase: evidence for the involvement of nuclear factor kappaB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 570–574.

Romanovsky, A.A., Shido, O., Sakurada, S., Sugimoto, N., Nagasaka, T., 1996. Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. *Am. J. Physiol.* 270, R693–R703.

Shimizu, T., Yamamoto, S., Hayaishi, O., 1979. Purification and properties of prostaglandin D synthetase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 254, 5222–5228.

Singh, S., Padovani, D., Leslie, R.A., Chiku, T., Banerjee, R., 2009. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J. Biol. Chem.* 284, 22457–22466.

Steiner, A.A., Antunes-Rodrigues, J., McCann, S.M., Branco, L.G., 2002a. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, R584–R593.

Steiner, A.A., Branco, L.G., 2002. Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 263–288.

Steiner, A.A., Rocha, M.J., Branco, L.G., 2002b. A neurochemical mechanism for hypoxia-induced anapyrexia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R1412–R1422.

Steiner, A.A., Branco, L.G., 2003. Fever and anapyrexia in systemic inflammation: intracellular signaling by cyclic nucleotides. *Front. Biosci.* 8, s1398–s1408. Steiner, A.A., Rudaya, A.Y., Robbins, J.R., Dragic, A.S., Langenbach, R., Romanovsky, A.

A., 2005. Expanding the febrigenic role of cyclooxygenase-2 to the previously overlooked responses. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1253–R1257.

Steiner, A.A., Ivanov, A.I., Serrats, J., Hosokawa, H., Phayre, A.N., Robbins, J.R., Roberts, J.L., Kobayashi, S., Matsumura, K., Sawchenko, P.E., Romanovsky, A.A., 2006. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol.* 4, e284.

Steiner, A.A., Hunter, J.C., Phipps, S.M., Nucci, T.B., Oliveira, D.L., Roberts, J.L., Scheck, A.C., Simmons, D.L., Romanovsky, A.A., 2009. Cyclooxygenase-1 or -2 – which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R485–R494.

Tamaki, Y., Nakayama, T., 1987. Effects of air constituents on thermosensitivities of preoptic neurons: hypoxia versus hypercapnia. *Pflug. Arch.* 409, 1–6.

Ueno, R., Narumiya, S., Ogorochi, T., Nakayama, T., Ishikawa, Y., Hayaishi, O., 1982. Role of prostaglandin D₂ in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6093–6097.

Wei, X., Zhang, B., Cheng, L., Chi, M., Deng, L., Pan, H., Yao, X., Wang, G., 2015. Hydrogen sulfide induces neuroprotection against experimental stroke in rats by down-

regulation of AQP4 via activating PKC. *Brain Res.* 1622, 292–299.

Yin, J., Tu, C., Zhao, J., Ou, D., Chen, G., Liu, Y., Xiao, X., 2013. Exogenous hydrogen sulfide protects against global cerebral ischemia/reperfusion injury via its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in rats. *Brain Res.* 1491, 188–196.