**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

2019

**Efeito do exercício físico na sinalização febrigênica
é modulado pela produção de sulfeto de hidrogênio
pré-óptico**

PPGRDF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
REABILITAÇÃO E DESEMPENHO FUNCIONAL
FMRP-USP

Jonatas Evandro Nogueira

Tese

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e
Desempenho Funcional

JONATAS EVANDRO NOGUEIRA

**Efeito do exercício físico na sinalização febrigênica é
modulado pela produção de sulfeto de hidrogênio pré-
óptico**

Ribeirão Preto
2019

JONATAS EVANDRO NOGUEIRA

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

**Efeito do exercício físico na sinalização febrigênica é
modulado pela produção de sulfeto de hidrogênio pré-
óptico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da 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
2019**

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.

Nogueira, Jonatas Evandro

Efeito do exercício físico na sinalização febrigênica é modulado pela produção de sulfeto de hidrogênio pré-óptico. Ribeirão Preto, 2019.

95p.: il. ; 30 cm

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

Orientador: Branco, Luiz Guilherme de Siqueira

1. Exercício Físico. 2. Endotoxina. 3. Febre. 4. Citocinas. 5. Corticosterona. 6. Hipotálamo. 7. H₂S. 8. CBS. 9. CSE. 10. 3-MPST. 11. Rato

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jonatas Evandro Nogueira

Efeito do exercício físico na sinalização febrigênica é modulado pela produção de sulfeto de hidrogênio pré-óptico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em: 25 /03 /2019

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Enrico Fuini Puggina

Instituição: Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

Profa. Dra.: Leila Maria Marchi Alves Ancheschi

Instituição: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Kênia Cardoso Bicego

Instituição: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio Aílton Nogueira e Rachel Leandrini Nogueira, aos meus irmãos, Marília de Cássia Nogueira Monteverde e Herbert Leandro Nogueira, pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Dedico também a minha esposa, Denise Poltoni Nogueira, por todo o companheirismo, paciência e contribuição durante a realização desta tese.

Mensagem

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Agradecimientos

• *Agradeço a Deus por me proporcionar a vida, a saúde, a paz e a sabedoria. Só Ele é capaz de nos guiar para enfrentar as dificuldades na nossa vida.*

• *Aos meus pais, Antonio Aílton Nogueira e Rachel Leandrini Nogueira por todos os ensinamentos ao longo da vida.*

• *Aos meus irmãos, Marília de Cássia Nogueira Monteverde e Herbert Leandro Nogueira pelo companheirismo.*

• *A minha esposa Denise Polloni Nogueira pela paciência, compreensão e apoio.*

• *Ao Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco pela acolhida em seu laboratório, pelos ensinamentos e pelas orientações durante esta tese.*

• *Aos Profs. Dr. José Antunes Rodrigues, Dra. Terezila Machado Coimbra, Dra. Evelin Capellari Carnio e Dr. Rafael Simone Saia pela colaboração em seus laboratórios.*

• *À profa. Dra. Luciana Renata Muzzeti Martinez pelos primeiros ensinamentos científicos durante a graduação.*

• *Aos amigos de Laboratório Bruna Maitan Santos, Clarissa Maria Dias Mota, Eduardo Alves Saramago, Gabriela Silva Borges, Glauber dos Santos Ferreira da Silva, Heloisa Della Coletta Francescato, João Paulo Jacob Sabino, Mateus Ramos Amorim, Maycon Tavares Emílio*

Silva, Patrícia Passaglia, Renato Nery Soriano e Rodrigo Alberto Restrepo Fernandez pelos ensinamentos e convivência durante este trabalho.

- *Aos técnicos de laboratórios Marcelo Eduardo Batalhão, Maria Valci Silva e Mauro Ferreira Silva pela grande colaboração na parte experimental deste trabalho.*

- *Ao secretário do programa da pós-graduação em reabilitação e desempenho funcional, Samuel Ribeiro Filipini, pela competência e prontidão para ajudar.*

- *Aos docentes do curso de pós-graduação pelo aprendizado.*

- *Aos funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto pelo cuidado com os animais.*

- *A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.*

- *Aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).*

1. INTRODUÇÃO	32
1.1. Sulfeto de hidrogênio	33
1.2. Termorregulação.....	34
1.3. Exercício físico	37
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo Geral	42
2.2. Objetivos específicos	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. Desenho experimental	44
3.2. Animais	45
3.3. Grupos experimentais	45
3.4. Treinamento na esteira	45
3.5. Cirurgia.....	47
3.6. Droga	48
3.7. Mensuração da Tc	48
3.8. Protocolos experimentais	48
3.8.1. Protocolo experimental 1	49
3.8.2. Protocolo experimental 2	49
3.8.3. Protocolo experimental 3	50
3.9. Amostra da região anteroventral da área pré-óptica (AVPO).....	50
3.10. Mensuração da taxa de produção do H ₂ S na POA	51
3.11. Imunodeteção de proteínas – Western blot.....	52
3.12. Quantificações dos níveis plasmáticos das citocinas e CORT	54
3.13. Análise estatística	54
4. RESULTADOS	56

4.1. Efeito do exercício físico sobre o peso corporal.....	57
4.2. Efeito do exercício físico na febre induzida pelo LPS	57
4.3. Efeito do exercício físico combinado ou não com o LPS na taxa de produção do H ₂ S na POA	59
4.4. Efeito do exercício físico combinado ou não com o LPS sobre as expressões proteicas das enzimas CBS, 3-MPST e CSE na POA	59
4.5. Efeito do exercício físico combinado ou não com o LPS nos níveis plasmáticos da IL-1 β , IL-6 e TNF- α	61
4.6. Correlação entre o H ₂ S na POA e os níveis plasmáticos das citocinas	63
4.7. Efeito do exercício físico combinado ou não com o LPS nos níveis plasmáticos do CORT	64
4.8. Correlação entre o H ₂ S na POA e os níveis plasmáticos do CORT	65
4.9. Correlação entre os níveis plasmáticos do CORT e citocinas.....	65
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	77
7. PERSPECTIVA	79
8. REFERÊNCIAS.....	81
9. ANEXO.....	94
9.1. Aprovação da comissão de ética no uso de animais	95

Lísta de abreviaturas

3-MPST	-	3-mercaptopiruvato enxofre transferase
3V	-	Terceiro ventrículo
AVPO	-	Anteroventral da área pré-óptica
°C	-	Grau Celsius
CBS	-	Cistationina beta-sintase
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO	-	Monóxido de carbono
CONCEA	-	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CORT	-	Corticosterona
CRP	-	Hormônio liberador de corticotrofina
CSE	-	Cistationina gama-liase
dL	-	Decilitro
DP	-	Desvio padrão
ELISA	-	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GY4137	-	Doador do H ₂ S
H ₂ S	-	Sulfeto de hidrogênio
HPA	-	Hipotálamo-pituitária-adrenal
ip	-	Intraperitoneal
IFN-γ	-	Interferon-gama
IL-1	-	Interleucina 1
IL-1ra	-	Receptor antagonista da Interleucina 1
IL-1β	-	Interleucina 1-beta
IL-6	-	Interleucina 6
IL-8	-	Interleucina 8
IL-10	-	Interleucina 10

IL-11	-	Interleucina 11
IL-18	-	Interleucina 18
KCl	-	Cloreto de potássio
kg	-	Kilograma
LPS	-	Lipopolissacarídeo
m/min	-	Metros/minutos
mg	-	Miligrama
min	-	Minuto
mL	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
mM	-	Milimolar
nm	-	Nanómetro
N	-	Normalidade
NaHS	-	Hidrossulfeto de sódio
ng	-	Nanograma
nmol		Nanomolar
NO	-	Óxido nítrico
pg	-	Picograma
pH	-	Potencial hidrogeniônico
POA	-	Área pré-óptica do hipotálamo
p/v	-	Peso/Volume
rpm	-	Rotação por minuto
SAMe	-	S-adenosil-l-metionina
SNC	-	Sistema nervoso central

sTNF-R	-	Receptor solúvel do fator de necrose tumoral
Ta	-	Temperatura ambiente
Tc	-	Temperatura corporal
Tci	-	Temperatura corporal inicial
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral-alfa
V _{máx}	-	Velocidade máxima de corrida
vs	-	versus
μ g	-	Micrograma
μ l	-	Microlitro
μ m	-	Micrômetro

Lista de figuras

Figura 1. Ilustração do procedimento experimental. *Adaptação (semana 1):* os ratos foram adaptados na esteira durante 5 dias a 10, 12, 13, 14 e 15 m/min por dia e a velocidade foi de 10, 15, 20, 25 e 30 min por dia (0% de inclinação). *Teste de esforço máximo (semana 1):* o teste de esforço máximo foi realizado para determinar a velocidade máxima de corrida ($V_{m\acute{a}x}$). *Treinamento físico (semanas 2 a 5):* os ratos correram na esteira 5 vezes por semana a 15 m/min (semana 2), 17 m/min (semana 3), 19 m/min (semana 4) e 20 m/min (semana 5) e a velocidade foi de 30 min (semana 2), 40 min (semana 3), 50 min (semana 4) e 60 min (semana 5). *Cirurgia (semana 4):* a cirurgia foi realizada para implantação da cápsula (*datalogger*) que registra a temperatura abdominal dos ratos. *Experimentos (semana 5):* administração do LPS (100 μ g/kg, ip) ou salina (1 ml/kg, ip) nos ratos treinados e sedentários (protocolos experimentais 1, 2 e 3).

Figura 2. Esteira para ratos Insight EP 131.

Figura 3. *Datalogger:* cápsula que registra a temperatura.

Figura 4. Desenho esquemático correspondente à localização (A) e punches bilaterais (B) da região anteroventral da área pré-óptica (AVPO) do encéfalo de rato. Adaptado de Paxinos & Watson (2005).

Figura 5. Decurso temporal da temperatura corporal profunda (T_c) dos ratos sedentários (A) e treinados (B) mostrando os efeitos da administração sistêmica do LPS. Os índices térmicos (C e D) dos períodos basais e febris esclarecem os dados mostrados pelas barras horizontais nos painéis A e B, respectivamente. A seta indica

o momento da injeção ip do LPS ou salina. Os valores são as médias $\pm$ DP. O número de animais em cada grupo é mostrado entre parênteses. * $P < 0,05$, grupos tratados com LPS vs. o respectivo grupo controle.

Figura 6. Níveis do H_2S na POA aos 120 minutos após a administração sistêmica de LPS ou salina. Sedentário salina ($n = 8$), sedentário LPS ($n = 6$), exercício salina ($n = 5$) e exercício LPS ($n = 5$). * $P < 0,05$, exercício LPS vs. os outros três grupos.

Figura 7. Níveis das expressões relativas das proteínas (CBS, 3-MPST e CSE) na POA aos 120 min após a administração sistêmica do LPS ou salina. O Painel A mostra as bandas representativas que refletem a intensidade do sinal de quimioluminescência para as proteínas de interesse estudadas em cada grupo experimental. O Painel B mostra a expressão relativa e a intensidade do sinal de quimioluminescência que reflete a banda da CSE e do rim de ratos, usado como controle. Os resultados são expressos como expressão relativa de CBS (C), 3-MPST (D) e CSE (E). Sedentário salina ($n = 7$), sedentário LPS ($n = 7$), exercício salina ($n = 6$) e exercício LPS ($n = 7$). * $P < 0,05$, Exercício LPS vs. Sedentário Salina e Sedentário LPS.

Figura 8. Níveis plasmáticos da $TNF-\alpha$ (A), $IL-1\beta$ (B) e $IL-6$ (C) aos 120 min após a administração sistêmica do LPS ou salina. Sedentário Salina ($n = 8$), Sedentário LPS ($n = 6$), Exercício Salina ($n = 5$) e Exercida LPS ($n = 5$). * $P < 0,05$, Sedentário LPS vs. os outros três grupos.

Figura 9. Análises de correlação entre H₂S e TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C).

Figura 10. Níveis plasmáticos de corticosterona aos 120 min após a administração sistêmica de LPS ou salina. Sedentário salina (n = 8), sedentário LPS (n = 6), exercício salina (n = 5) e exercício LPS (n = 5). * P <0,05, Grupos tratados com LPS vs. o respectivo grupo controle.

Figura 11. Análise de correlação entre H₂S e corticosterona.

Figura 12. Análises de correlação entre corticosterona e TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C).

Tabela 1. Quantidade de dias, tempo (minutos) e velocidade (m/min) de adaptação dos animais na esteira.

Tabela 2. Quantidade de semanas, tempo (minutos), velocidade (m/min) e % da $V_{m\acute{a}x}$ do treinamento dos animais na esteira.

Tabela 3. Peso corporal final médio dos animais sedentários e treinados, tratados com LPS ou salina.

Resumo

Nogueira, JE. Efeito do exercício físico na sinalização febrigênica é modulado pela produção de sulfeto de hidrogênio pré-óptico. (Tese). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2019.

O exercício físico causa alterações estruturais e funcionais em vários sistemas fisiológicos, incluindo o sistema imune. Variações importantes da temperatura corporal (T_c) são observadas durante o desafio imune induzido pela endotoxina lipopolissacarídeo (LPS). Essas variações da T_c são finamente reguladas por neurotransmissores frente à inflamação sistêmica causada pelo LPS. Entre os moduladores, o neurotransmissor gasoso sulfeto de hidrogênio (H_2S) participa dessa regulação modulando a inflamação sistêmica induzida pelo LPS em ratos. O H_2S atua como uma molécula anti-inflamatória e criogênica, embora não são completamente entendidos seus mecanismos de ação. Assim, testamos a hipótese de que o H_2S , na área pré-ótica (POA) do hipotálamo, modula a sinalização febrigênica de forma diferente em ratos sedentários e treinados, em um modelo de inflamação sistêmica. Os ratos correram durante 4 semanas em uma esteira antes de receber uma injeção intraperitoneal de LPS (100 μ g/kg) ou salina (1 ml/kg). Analisamos a taxa de produção do H_2S e das expressões proteicas das enzimas relacionadas com o H_2S , a cistationina beta-sintase (CBS), 3-mercaptopiruvato enxofre transferase (3-MPST) e cistationina gama-liase (CSE) na POA. Também medimos a temperatura corporal (T_c), níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), das interleucinas (IL)-1 β e IL-6 e corticosterona (CORT). A magnitude das mudanças da T_c durante a febre induzida pelo LPS encontrada foi semelhante entre os ratos sedentários e treinados. Nos ratos sedentários, a produção de H_2S não foi afetada pelo LPS. Por outro lado, nos ratos treinados, o

LPS causou um aumento acentuado da taxa de produção do H_2S que foi acompanhada do aumento da expressão da CBS, enquanto as expressões da 3-MPST e da CSE foram mantidas relativamente constantes. Os ratos sedentários tiveram significativa liberação das citocinas ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$) induzida pelo LPS, que foi praticamente abolida nos animais treinados. Foi observada correlação entre H_2S e $TNF-\alpha$, bem como H_2S e $IL-6$. Os níveis de CORT estavam aumentados após a injeção de LPS em ambos os grupos. Encontramos correlações entre H_2S e CORT, e entre CORT e $IL-1\beta$. Esses dados são coerentes com o fato de que as respostas à inflamação sistêmica são rigorosamente reguladas por meio de ajustes na produção do H_2S na POA que pode desempenhar um papel anti-inflamatório, reduzindo os níveis de citocinas plasmáticas ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$) e aumentando a liberação de CORT.

Palavras-chaves: H_2S , CBS, CSE, 3-MPST, hipotálamo, febre, citocinas, endotoxina, corticosterona, treinamento físico, ratos.

Abstract

Nogueira, JE. Effect of physical exercise on the febrigenic signaling is modulated by preoptic hydrogen sulfide production. (Thesis). Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Medicine of Ribeirão Preto; 2019.

Physical exercise causes structural and functional changes in many physiological systems, including the immune system. Important changes in body temperature (Tb) are observed during endotoxin (lipopolysaccharide - LPS)-induced immune challenge. These Tb changes are finely regulated by neurotransmitters against systemic inflammation caused by LPS. Among the modulators, hydrogen sulfide (H₂S) gaseous neurotransmitter modulates the systemic inflammation induced by LPS in rats. H₂S play as an anti-inflammatory and cryogenic molecule, although their mechanisms of action are not fully understood. Therefore, we tested the hypothesis that the H₂S in the preoptic area (POA) of the hypothalamus modulates the febrigenic signaling differently in sedentary and trained rats, in an animal model of systemic inflammation. Rats run for 4 weeks on a treadmill before receiving an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 100 µg/kg) or saline (1 ml/kg). We measured H₂S production rate and protein expressions of H₂S-related synthases cystathionine β-synthase (CBS), 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MPST) and cystathionine γ-lyase (CSE) in the POA. We also measured deep body temperature (Tb), circulating plasma levels of tumor necrosis factor- α, interleukin (IL)-1 β and IL-6, and corticosterone (CORT). The magnitude of changes of Tb during the LPS-induced fever was found to be similar between sedentary and trained rats. In sedentary rats, H₂S production was not affected by LPS. Conversely, in trained rats LPS caused a sharp increase in H₂S production rate that was accompanied by an increased CBS

expression profile, whereas 3-MPST and CSE expressions were kept relatively constant. Sedentary rats showed a significant LPS-induced release of cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) which was virtually abolished in the trained animals. Correlation between POA H₂S and IL-6 as well as TNF- α was observed. CORT levels were augmented after LPS injection in both groups. We found correlations between H₂S and CORT, and CORT and IL-1 β . These data are consistent with the notion that the responses to systemic inflammation are tightly regulated through adjustments in POA H₂S production which may play an anti-inflammatory role downmodulating plasma cytokines levels and upregulating CORT release.

Keywords: H₂S, CBS, CSE, 3-MPST, hypothalamus, fever, cytokines, endotoxin, physical training, corticosterone, rats.

1. Introdução

1.1. Sulfeto de hidrogênio

O Sulfeto de hidrogênio (H_2S) é um gás incolor, inflamável e tóxico que possui um odor característico forte. É encontrado em gases vulcânicos, gás natural e também como resultado da decomposição bacteriana de matéria orgânica na ausência de oxigênio (digestão anaeróbia) (Powell *et al.*, 2017).

Muitos estudos sobre o H_2S abordam sua toxicidade desde a primeira descrição em 1713 (Warenycia *et al.*, 1989; Kombian *et al.*, 1993). Um exemplo do efeito tóxico deste gás é a perda de memória, comum em sobreviventes com intoxicações pelo sulfeto. Os altos níveis de H_2S encontrados no encéfalo de ratos, humanos e bovinos (Goodwin *et al.*, 1989; Warenycia *et al.*, 1989; Savage e Gould, 1990) são evidências que este gás pode ter uma função fisiológica (Kimura, 2010). Apesar dos estudos sobre os efeitos tóxicos do H_2S , pouco é conhecido sobre sua função fisiológica.

O H_2S tem sido descrito como o terceiro membro entre os transmissores gasosos que inclui o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO) (Wang, 2002; Szabo, 2007). O H_2S foi inicialmente descrito como molécula sinalizadora, possivelmente com função neuromoduladora (Abe e Kimura, 1996). Além disso, atua como protetor contra o estresse oxidativo em neurônios (Kimura e Kimura, 2004). Apesar dos mecanismos de liberação não serem ainda totalmente compreendidos, este pode ser produzido por reações enzimáticas e imediatamente liberado após a sua produção (Abe e Kimura, 1996). A principal via metabólica de produção do H_2S tem como precursor o aminoácido cisteína. Três enzimas participam desta via: cistationina beta-sintase (CBS), cistationina gama-liase (CSE) e 3-mercaptopiruvato enxofre transferase (3-MPST) (Tanizawa, 2011). No encéfalo, este gás é produzido

principalmente por meio da enzima CBS, enquanto a enzima CSE é predominantemente encontrada nos tecidos periféricos e a enzima 3-MPST pode ser encontrada tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto nos tecidos periféricos (Powell *et al.*, 2018).

O H₂S desempenha papéis importantes em várias condições fisiopatológicas. No encéfalo, este gás modula a atividade sináptica (Abe e Kimura, 1996; Kimura, 2014), aumenta a taxa de sobrevivência de ratos expostos a hipóxia letal (Blackstone e Roth, 2007), parece desempenhar um importante papel anti-inflamatório (Kimura *et al.*, 2005) e está presente na área pré-óptica do hipotálamo (POA) (Kwiatkoski *et al.*, 2013), a região hierarquicamente mais importante envolvida na termorregulação (Blatteis, 2006).

1.2. Termorregulação

Os animais homeotérmicos são capazes de manter sua temperatura corporal (T_c) relativamente constante em diferentes temperaturas ambientais. A regulação da T_c dá-se pelos mecanismos comportamentais e autonômicos que alteram as taxas de produção e dissipação de calor (Romanovsky, 2007).

A busca por uma temperatura ambiente (T_a) confortável (Romanovsky *et al.*, 2002), o aumento da salivação em roedores (Schwimmer *et al.*, 2004) e os ajustes da postura em relação à área corporal exposta ao ambiente (Nagashima *et al.*, 2000) estão relacionados aos mecanismos comportamentais. Por outro lado, os mecanismos autonômicos são divididos entre os responsáveis pela produção e dissipação de calor. A produção de calor é decorrente do metabolismo celular (Ricquier, 2006), tremor e mobilização do metabolismo do tecido adiposo marrom

(Nagashima *et al.*, 2000). A dissipação de calor baseia-se essencialmente na modulação da vascularização cutânea. Além disso, ainda existe a possibilidade de perda de calor evaporativo, pela sudorese em humanos e salivação em ratos (Stocks *et al.*, 2004). Ainda em ratos, salienta-se que o aumento do fluxo sanguíneo provocado pela vasodilatação periférica facilita a dissipação de calor através da cauda.

A regulação da T_c é mediada por neurônios presentes no SNC, principalmente da área pré-óptica do hipotálamo anterior (POA) que são sensíveis ao calor e ao frio (Nagashima, 2006; Tansey e Johnson, 2015). O controle autonômico da T_c sofre variações de acordo com a temperatura do ambiente (T_a) (Nagashima *et al.*, 2000), entre vários outros fatores.

As alterações da T_a , captadas por termorreceptores cutâneos, ativam as áreas do SNC responsáveis pelas respostas termorregulatórias. A POA é considerada a região hierarquicamente mais importante para o controle da T_c (Gordon, 1990). A POA processa as informações dos termorreceptores periféricos, situados na pele, bem como aqueles localizados nas vísceras e no próprio SNC (McCleskey, 1997). Os neurônios sensíveis ao calor produzem sinais excitatórios para a dissipação de calor e inibitórios para produção de calor através do bloqueio dos neurônios sensíveis ao frio. Assim, os neurônios sensíveis ao calor são os principais efetores tanto da perda quanto da produção de calor (Boulant, 2000; Nagashima, 2006; Romanovsky, 2007).

Este sistema de controle da T_c pode sofrer ajustes finamente regulados (Branco *et al.*, 2014). Por exemplo, a eficiência do sistema imune pode aumentar elevando-se a T_c (febre), como acontece frente à infecção (Kluger, 1991). A febre é

o aumento controlado da Tc e a maior característica da resposta de fase aguda. Ela pode ser induzida por pirógenos exógenos e/ou endógenos, originada por meio da coordenação de eventos regulados e modulados por mediadores pró- e anti-inflamatórios (Blatteis, 2006).

Para se estudar os mecanismos responsáveis pelo desafio imune, o modelo mais utilizado pela comunidade científica baseia-se na administração de lipopolissacarídeo (LPS), caracterizando-se o modelo de inflamação sistêmica. Quando utilizado em baixas doses, o animal apresenta uma resposta febril polifásica (Romanovsky *et al.*, 2005), enquanto doses altas causam uma resposta bifásica caracterizada, na maior parte das vezes, por hipotermia que antecede a resposta febril (Liu *et al.*, 2012). O LPS é um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas (Kluger, 1991) que é utilizado para reproduzir a febre através de injeção intraperitoneal (ip). O estado febril instala-se quando os mecanismos termorregulatórios passam a ser controlados mediante um novo *set point*, mais elevado que o do estado eutérmico (normal). A porção lipídica do LPS, denominada *Lipídeo A*, causa seus efeitos pirogênicos, estimulando os macrófagos a produzirem mediadores proteicos (pirógenos endógenos), lipídicos e radicais livres. Dentre os mediadores proteicos destacam-se principalmente as seguintes citocinas: o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e o interferon- γ (IFN- γ) (Blatteis e Sehic, 1997; Blatteis, 2006). Por sua vez, a prostaglandina E₂ (PGE₂), a tromboxana A₂ e o fator de ativação plaquetária são considerados os principais mediadores inflamatórios lipídicos.

1.3. Exercício físico

O exercício físico provoca alterações estruturais e funcionais em diversos sistemas no organismo, incluindo o sistema imune (Malm, 2004). Estudos recentes indicam que o exercício físico regular parece ter ação anti-inflamatória no organismo (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Petersen e Pedersen, 2005; Pedersen e Febbraio, 2008; Gleeson *et al.*, 2011; Pedersen e Febbraio, 2012). A redução da gordura visceral, o aumento da produção e liberação de citocinas pelo músculo (Petersen e Pedersen, 2005; Mathur e Pedersen, 2008; Pedersen e Febbraio, 2008) e a redução da expressão dos receptores do tipo Toll (Toll-like receptors) nos macrófagos e neutrófilos (Flynn e Mcfarlin, 2006) são sugeridos como possíveis mecanismos para explicar esse efeito anti-inflamatório do exercício físico.

Estudos demonstram que o trabalho muscular parece ser responsável por aumentar a produção e liberação das citocinas durante e após o treinamento físico, em resposta aos micro-traumas ocasionados no sistema músculo-esquelético (Keller *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2001; Steensberg *et al.*, 2001; Peake *et al.*, 2015). Em sessão aguda de treinamento físico, é observado, de modo geral, aumento das citocinas pró- e anti-inflamatórias ao término do treinamento, com retorno aos valores basais dentro de algumas horas (Petersen e Pedersen, 2005; Mathur e Pedersen, 2008). No período pós-exercício, é possível que a IL-6 seja a primeira citocina a ter sua concentração aumentada no plasma, enquanto alguns estudos indicam que a IL-1 β e TNF- α não apresentam alterações consistentes (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Pedersen *et al.*, 2001; Febbraio e Pedersen, 2002). Além disso, há relatos que indicam que o exercício pode causar aumento no nível de

citocinas anti-inflamatórias inibidoras como o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra) e o receptor solúvel do TNF (sTNF-R) (Ostrowski *et al.*, 1999; Ostrowski *et al.*, 2000). Dessa forma, o exercício parece provocar um aumento da citocina IL-6, seguida pelo aumento do sTNF-R, IL-1ra e da interleucina 10 (IL-10) (Petersen e Pedersen, 2005). A ação anti-inflamatória da IL-6 derivada do músculo requer investigações mais profundas, pois a IL-6 também é considerada uma citocina pró-inflamatória (Abeywardena *et al.*, 2009). Além disso, a produção das citocinas em decorrência da sessão aguda do exercício físico, não se limita apenas ao músculo esquelético (Haahr *et al.*, 1991; Lyngso *et al.*, 2002). O aumento da IL-6 em resposta ao exercício agudo parece estar relacionado com a intensidade. Os aumentos nos níveis de IL-6 pode não ocorrer com exercícios de baixa e moderada intensidade (Fischer, 2006). Entretanto, mesmo com baixa ou moderada intensidade, o exercício físico pode reduzir os marcadores inflamatórios (Zoppini *et al.*, 2006; Olson *et al.*, 2007). Portanto, outros mecanismos, além apenas da ação da IL-6, podem estar envolvidos na ação anti-inflamatória do exercício físico.

Embora o aumento agudo da concentração de IL-6 seja considerado um efeito anti-inflamatório (Pedersen e Febbraio, 2008; 2012), muitas doenças crônicas apresentam um aumento crônico de IL-6. Assim, há uma controvérsia entre os benefícios dessa citocina. Entretanto, o aumento agudo e transitório da IL-6 durante o exercício é capaz de aumentar a oxidação de gorduras e reduzir a resistência à insulina (Pedersen e Fischer, 2007), enquanto que o aumento permanente levaria aos efeitos contrários citados (Senn *et al.*, 2002). No entanto, o aumento agudo da IL-6, observado após o exercício, retorna aos valores basais dentro de duas a três horas (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). O aumento temporário da IL-6, após o

treinamento, parece estar relacionado com o início de uma resposta anti-inflamatória, que, após um período de treinamento, pode ter uma redução dos valores basais.

Os efeitos crônicos do exercício seriam em função das somatórias das respostas observadas pelo exercício agudo (Pedersen, 2013). Ratos treinados na esteira durante quatro semanas tiveram TNF- α e IL-1 β atenuados após administração de LPS (Chen *et al.*, 2007) e ratos exercitados voluntariamente em roda durante oito semanas tiveram níveis plasmáticos de IL-10 e IL-1 β aumentados e diminuídos, respectivamente. Não houve alteração significativa para os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α (Rowsey *et al.*, 2009).

Estes estudos anteriores (Chen *et al.*, 2007; Rowsey *et al.*, 2009) não integram as respostas imunes (mensuradas por meio de dosagens das citocinas plasmáticas) com medidas da Tc (que representa o 'marco' da resposta de fase aguda, causada pela inflamação sistêmica). Neste trabalho, utilizamos o modelo (Romanovsky *et al.*, 2005) mais bem aceito para estudo das respostas fisiológicas observadas durante a inflamação sistêmica, associado ao exercício físico crônico.

O exercício físico pode causar estresse fisiológico para o animal, sendo capaz de ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Esta ativação resulta no aumento da secreção de glicocorticoides que, por sua vez, exercem inúmeras ações no organismo. Os níveis de corticosterona (CORT) plasmático parece ser aumentado após períodos curtos e agudos (Huang *et al.*, 2006) e pode retornar aos níveis basais em períodos longos e crônicos do exercício físico (Kawashima *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007). O hormônio CORT possui ação antipirética, sendo capaz

de atenuar a febre na inflamação sistêmica (Coelho *et al.*, 1992). Neste trabalho, avaliamos a participação do CORT em nosso modelo experimental.

Portanto, sabendo que (i) o H₂S é produzido endogenamente na POA e modula a febre induzida pelo LPS e que (ii) o exercício físico afeta o sistema imune modulando a produção e liberação de citocinas e CORT, o presente estudo foi realizado para testar a hipótese de que o efeito inibitório do exercício físico sobre a sinalização febrigênica é regulado pela produção do H₂S na POA.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Analisar os efeitos do exercício físico sobre a febre induzida pelo LPS em ratos treinados e sedentários.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1. Mensurar a taxa de produção do H_2S e quantificar as expressões das enzimas CBS, 3-MPST e CSE na POA dos ratos treinados e sedentários após a realização do desafio imune com LPS.

2.1.2. Quantificar os níveis plasmáticos das citocinas $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$ nos ratos treinados e sedentários após a injeção do LPS e salina.

2.1.3. Medir as concentrações do CORT plasmático em ratos treinados e sedentários após a administração do LPS e salina.

3. Materiais e Métodos

3.1. Desenho experimental

Os animais foram adaptados, selecionados, passaram pelo teste de $V_{\text{máx}}$ e foram treinados na esteira durante 4 semanas. Foi realizada a cirurgia para a implantação do *datallogger* uma semana antes dos experimentos. Posteriormente, 24h após a última sessão de treino, foram realizados os protocolos experimentais com aplicação do LPS ou salina e registros da T_c nos ratos treinados e sedentários. Após a eutanásia, o sangue foi coletado para análise das citocinas ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6) e o encéfalo para dosagens do H_2S e quantificação das enzimas CBS, 3-MPST e CSE (Fig. 3).

Figura 1. Ilustração do procedimento experimental. *Adaptação (semana 1)*: os ratos foram adaptados na esteira durante 5 dias a 10, 12, 13, 14 e 15 m/min por dia e a velocidade foi de 10, 15, 20, 25 e 30 min por dia (0% de inclinação), respectivamente. *Teste de esforço (semana 1)*: o teste de esforço máximo foi realizado para determinar a velocidade máxima de corrida ($V_{\text{máx}}$). *Treinamento físico (semanas 2 a 5)*: os ratos correram na esteira 5 vezes por semana a 15 m/min (semana 2), 17 m/min (semana 3), 19 m/min (semana 4) e 20 m/min (semana 5) e a velocidade foi de 30 min (semana 2), 40 min (semana 3), 50 min (semana 4)

e 60 min (semana 5), respectivamente. *Cirurgia (semana 4)*: a cirurgia foi realizada para implantação da cápsula (*data logger*) que registra a temperatura abdominal dos ratos. *Experimentos (semana 5)*: administração do LPS (100 µg/kg, ip) ou salina (1 ml/kg, ip) nos ratos treinados e sedentários (protocolos experimentais 1, 2 e 3).

3.2. Animais

Ratos Wistar (140-150 g - início do programa de treinamento) foram obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto. Os ratos foram acondicionados em caixas plásticas com maravalha e tampa metálica, tiveram livre acesso à água e comida e foram abrigados em uma câmara com a temperatura controlada em 24-25°C com ciclo claro-escuro de 12:12h. Os experimentos foram realizados entre 8h e 10h. Este projeto segue as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Odontologia do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (2015.1.973.58.7).

3.3. Grupos experimentais

Os animais foram randomizados em 4 grupos experimentais: Animais sedentários e treinados, tratados com salina ou LPS.

3.4. Treinamento na esteira

Os ratos foram adaptados, selecionados e treinados na esteira motorizada para ratos (modelo Insight EP 131) (Figura 2). A adaptação e seleção ocorreu

durante 1 semana a 10 minutos, aumentando 5 minutos a cada dia, até chegar a 30 minutos no quinto dia de adaptação. A velocidade no primeiro dia foi de 10 m/min, no segundo dia de 12 m/min, no terceiro dia de 13 m/min, no quarto dia de 14 m/min e no quinto dia de 15m/mim (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de dias, tempo (minutos) e velocidade (m/min) de adaptação dos animais na esteira.

1º	2º	3º	4º	5º	<i>dia</i>
10	15	20	25	30	<i>min</i>
10	12	13	14	15	<i>m / min</i>

Os ratos que completaram a adaptação foram submetidos ao teste incremental de esforço para determinar a velocidade máxima de corrida ($V_{m\acute{a}x}$). A intensidade do exercício foi aumentada em 3 m/min a cada 3 minutos a 0% de inclinação (Ferreira *et al.*, 2007). Após, os ratos foram treinados durante 4 semanas, 5 vezes por semana. Na primeira semana o tempo de treinamento foi de 30 minutos e a intensidade de 60% da $V_{m\acute{a}x}$ (média de 15 m/min). Na segunda semana o tempo foi de 40 minutos e a intensidade de 70% da $V_{m\acute{a}x}$ (média de 17 m/min). Na terceira semana o tempo foi de 50 minutos e a intensidade de 75% da $V_{m\acute{a}x}$ (média de 19 m/min) e na quarta semana o tempo foi de 60 minutos e a intensidade de 80% da $V_{m\acute{a}x}$ (média de 20 m/min) (Tabela 2). Esse método foi adotado, com algumas modificações, a partir de estudos anteriores em ratos (Contarteze *et al.*, 2008) e camundongos (Ferreira *et al.*, 2007).

Tabela 2. Quantidade de semanas, tempo (minutos), velocidade (m/min) e % da Vmáx do treinamento dos animais na esteira.

1º	2º	3º	4º	semana
30	40	50	60	min
15	17	19	20	m / min
60	70	75	80	% Vmáx

Figura 2. Esteira para ratos Insight EP 131.

3.5. Cirurgia

O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia de cetamina-xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente; 1 ml/kg, ip). Os ratos foram submetidos à laparotomia mediana para inserção de uma cápsula que registra a temperatura (*datalogger* - SubCue, Calgary, Alberta, Canadá – Figura 3) na cavidade peritoneal. Após a cirurgia, cada animal recebeu uma dose de antibiótico ($160.000 \text{ U kg}^{-1}$ benzilpenicilina, intramuscular) e analgésico (Flunixinina; $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$, subcutânea). A cirurgia foi realizada uma semana antes dos experimentos.

Figura 3. *Datalogger*: cápsula que registra a temperatura.

3.6. Droga

O LPS (obtido a partir de *E. Coli*, sorotipo 0111:B4, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em salina estéril livre de pirógenos. Com base em trabalhos anteriores (Steiner, Antunes-Rodrigues e Branco, 2002; Steiner, Antunes-Rodrigues, Mccann, *et al.*, 2002; Steiner e Branco, 2002), a dose do LPS administrada (ip) foi de 100 µg/kg de peso corporal em um volume de 0,25 mL.

3.7. Mensuração da Tc

A Tc dos animais foi registrada e gravada a cada 5 minutos de intervalo durante todo o experimento pelo *datalogger*.

3.8. Protocolos experimentais

Em todos os protocolos experimentais, após a última sessão de treino (ou não - grupo dos sedentários), os animais foram colocados individualmente em uma sala

com a Ta fixada em 24°C. Esta Ta foi mantida constante ao longo dos experimentos. Vinte e quatro horas após a última sessão de treino, os ratos treinados receberam uma dose de 100 µg/kg (ip) de LPS (sorotipo 0111: B4, Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolvido em salina livre de pirógenos. A salina foi injetada em outro grupo de ratos treinados como controle (1 ml/kg, ip). Os grupos de ratos sedentários receberam o mesmo tratamento, isto é, a injeção de LPS ou de salina na mesma dose. A Ta e a dose de LPS foram escolhidas com base em estudo prévio (Kwiatkoski *et al.*, 2013). Durante os protocolos experimentais, os ratos foram monitorados continuamente quanto ao seu comportamento. Os ratos controle tratados com salina não apresentaram alterações no seu comportamento, condição corporal e bem-estar. Por outro lado, os ratos tratados com LPS mostraram sinais típicos de doença, como mobilidade reduzida e piloereção, mas não observamos mortalidade.

3.8.1. Protocolo experimental 1

Este protocolo experimental foi realizado para avaliar o efeito do exercício físico na eutermia ou na febre induzida pelo LPS. O LPS (100 µg/kg, ip) ou salina (1 ml/kg, ip) foram administrados nos ratos sedentários e treinados. A Tc foi registrada durante 6 horas, iniciando 1 hora antes do tratamento.

3.8.2. Protocolo experimental 2

O segundo protocolo experimental teve como objetivo avaliar a taxa de produção do H₂S na POA e os níveis de citocinas (TNF-α, IL-1β e IL-6) e CORT plasmática produzidas 2 horas após a administração do LPS. O LPS (100 µg/kg, ip)

ou salina (1 ml/kg, ip) foram administrados nos ratos sedentários e treinados. A Tc foi registrada durante 3 horas, iniciando 1 hora antes do tratamento. Duas horas após a administração do LPS ou salina os ratos foram decapitados e o sangue e encéfalo coletados.

3.8.3. Protocolo experimental 3

Neste protocolo experimental foram avaliadas as expressões proteicas da CBS, 3-MPST e CSE na POA dos ratos 2 horas após a administração de LPS. Foi injetado LPS (100 µg/kg, ip) ou salina (1 ml/kg, ip) nos ratos sedentários ou treinados. Duas horas após a administração de LPS ou salina os ratos foram decapitados e os encéfalos coletados.

3.9. Amostra da região anteroventral da área pré-óptica (AVPO)

Os ratos sedentários e treinados foram decapitados 2 horas após a administração de LPS ou salina e os seus encéfalos foram rapidamente removidos, congelados por submersão em isopentano no gelo seco e armazenados a -70 °C. A região da AVPO do hipotálamo foi captada em um criostato por uma agulha perfuradora (diâmetro interno de 0,9 mm). Foi retirada uma fatia de 500 µm de espessura para o protocolo 2 e uma fatia de 1500 µm de espessura para o protocolo 3 do hipotálamo anterior, com base nas seguintes referências: ventral, quiasma óptico; dorsal, comissura anterior; mediana, terceiro ventrículo (3V) (Figura 4A). "Punches" bilaterais foram realizadas acima do limite dorsal do quiasma óptico e na parede lateral esquerda e direita do 3V (Figura 4B).

Figura 4. Desenho esquemático correspondente à localização (A) e punches bilaterais (B) da região anteroventral da área pré-óptica (AVPO) do encéfalo de rato. Adaptado de Paxinos & Watson (2005).

3.10. Mensuração da taxa de produção do H_2S na POA

Os níveis do H_2S foram determinados como previamente descrito (Stipanuk e Beck, 1982; Kwiatkoski *et al.*, 2013; Kwiatkoski *et al.*, 2014). As amostras bilaterais

da AVPO foram homogeneizadas em tampão de fosfato de potássio (100 mM; pH 7,4) utilizando um microprocessador (VirTis, Gardiner, NY, EUA). Cada amostra (50% p/v; 100 µl) continha L-cisteína (10 mM; 20 µl), piridoxal- 5'-fosfato (2 mM; 20 µl) e PBS (30 µl). A reação foi realizada em tubos de eppendorf tampados com parafilmes, transferindo-os do gelo para banho-maria a 37 °C. Após incubação durante 2 horas, adicionou-se acetato de zinco (1% p/v; 100 µl) para reter o H₂S seguido por ácido tricloroacético (10% p/v; 100 µl) para precipitar as proteínas e parar a reação. Após a centrifugação, adicionou-se sulfato de N,N-dimetil-p-fenilenodiamina (20 mM; 50 µl) em HCl 7,2 M seguido de FeCl₃ (30 mM; 50 µl) em HCl 1,2 M a 50 µl do sobrenadante; e a densidade ótica foi medida a 670 nm. A curva de calibração da absorvância foi obtida utilizando as soluções de Na₂S (0,1-100 µg/ml). Para avaliar o teor de proteína das amostras, os *pellets* foram diluídos em 4 ml de hidróxido de sódio (0,1 N). A solução foi analisada utilizando um reagente corante proteico (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA, código: 500-0006).

3.11. Imunodeteção de proteínas - *Western blot*

As expressões proteicas da CBS, 3-MPST e da CSE foram mensuradas na AVPO utilizando a técnica de *western blot*. O tecido bilateral da AVPO foi homogeneizado a 4 °C em tampão de lise (contendo 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl, Triton X-100 a 1%, SDS a 0,1%, 1 µg/mL de aprotinina, 1 µg/mL de leupeptina, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 1 mM de ortovanadato de sódio, pH 10, 1 mM de pirofosfato de sódio, 25 mM de fluoreto de sódio e 0,001 M de EDTA, pH 8). Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 40.000 rotações

por minutos (rpm) durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido para análise. A concentração de proteína nos tecidos homogeneizados foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando um reagente corante de proteína (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, EUA, código: 500-0006). As alíquotas contendo 30 µg de proteína foram dissolvidas em tampão de carregamento. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (10%), transferidas para membranas de nitrocelulose, incubadas durante 1 h em 50 mL de tampão de bloqueio (PBS, 2,5% de leite desnatado) e lavados em tampão (PBS, Tween 20 a 0,1%, pH 7,6). Em seguida, as membranas foram incubadas com o correspondente anticorpo primário em 5% de albumina de soro bovino, durante a noite a 4 °C. Os anticorpos primários foram: anticorpo monoclonal anti-mouse CBS (1:1000, Cell Signalling Technology, Beverly, MA), anticorpo policlonal anti-mouse MPST (1:250, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e anticorpo monoclonal anti-CSE (1:3000, Abnova Corporation, Taipei, Taiwan). Após, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (1:5000; Dako, Glostrup, Denmark) conjugado com peroxidase de rábano durante 1 h à temperatura ambiente. As proteínas marcadas foram detectadas utilizando o substrato quimioluminescente *SuperSignal West Pico* (Pierce, Rockford, IL, EUA). Para extração, as membranas foram recuperadas em tampão de separação (100 mM de 20-mercaptoetanol, 2% de dodecil sulfato de sódio, 62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8) durante 30 minutos a 50 °C. Para ajustar a equivalência, as membranas foram lavadas com TBS-T antes de bloquear e incubadas com anticorpo primário monoclonal anti- α 1-tubulina (1:5000, Sigma-Aldrich, em 5% de albumina de soro bovino) durante a noite, a 4° C. Finalmente, a intensidade das bandas identificadas

foram quantificadas com o sistema de análise de imagem (Molecular Imaging Systems, Eastman Kodak Company, Rochester, NY). Os dados foram normalizados utilizando α 1-tubulina e representados como expressão relativa (enzima de interesse / α 1-tubulina).

3.12. Quantificações dos níveis plasmáticos das citocinas e CORT

Os ratos sedentários e treinados foram decapitados 2 horas após a administração de LPS ou salina e o sangue foi recolhido, via cervical, em tubos Falcon revestidos com heparina. Após, os tubos foram centrifugados (3.500 rpm, 20 min, 4° C) e os plasmas foram aliquotados em tubos do tipo eppendorf e armazenados a -70 °C. Os níveis plasmáticos das citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) foram determinados utilizando kits específicos de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para cada citocina (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis plasmáticos de CORT foram avaliados utilizando uma técnica específica de radioimunoensaio. Os níveis plasmáticos do corticosterona foram determinados utilizando o radioimunoensaio específico após extração com etanol. O antisoro do corticosterona foi adquirido da Sigma e a 1,2,6,7-3 H-corticosterona da GE Healthcare Life Sciences (Milwaukee, WI, EUA).

3.13. Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Os valores da Tc (°C) foram registrados com intervalos de 5 minutos e apresentados como valores brutos (Fig 5). A Tc inicial (Tci) representa os valores médios da Tc medidos em

intervalos de 5 minutos durante os 60 minutos do período de aclimatização. O índice térmico, expresso em °C x min (Fig 5C e 5D), foi calculado a partir da área sob a curva, de -60 a 0 minutos (registros basais) e de 240 a 300 minutos (fase febril). Os níveis do H₂S na POA estão expressos como nmol/mg de proteína/h (Fig 6). As expressões das proteínas são apresentadas como a expressão relativa da enzima de interesse / α 1-tubulina (Fig 7). Os níveis plasmáticos do TNF- α , IL-1 β e IL-6, (Fig 8) e CORT (Fig. 10) são expressos como pg/mL e ng/mL, respectivamente. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguidos do pós-teste de Bonferroni. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para determinar a correlação entre as variáveis (Figs 9, 11 e 12). O nível de significância adotado foi P<0,05.

4. Resultados

4.1. Efeito do exercício físico sobre o peso corporal

A Tabela 3 apresenta o peso corporal final médio dos animais utilizados nos experimentos. O peso corporal dos animais treinados foi menor estatisticamente em relação aos animais sedentários.

Tabela 3. Peso corporal final médio dos animais sedentários e treinados, tratados com LPS ou salina.

	SED SAL (n=23)	SED LPS (n=21)	EX SAL (n=16)	EX LPS (n=17)
Peso corporal (g)	413,0±8,2	408,0±13,5	337,5±9,8*	341,0±7,4*

* vs. Sedentário salina e sedentário LPS (P<0,05).

4.2. Efeito do exercício físico na febre induzida pelo LPS

Investigamos o efeito do exercício físico na modulação da febre induzida pelo LPS. A administração intraperitoneal de salina não causou alterações na Tc dos ratos sedentários e treinados. Por outro lado, a injeção intraperitoneal do LPS causou a resposta febril típica nestes dois grupos de ratos (Fig. 5A e 5B). Os índices térmicos da fase basal e febril (área sobre a curva, indicados pelas barras horizontais nas Figs. 5A e 5B) foram calculados para tornar claras as alterações na Tc observadas nos ratos sedentários (Fig. 5C) e treinados (Fig. 5D). Conforme mostrado na Fig. 5C, o LPS causou um aumento significativo (P<0,05) na Tc (febre) dos ratos sedentários. A Fig. 5D mostra que a administração de LPS nos ratos treinados também causou um aumento significativo (P<0,05) na Tc (febre) quando

comparado com o respectivo grupo controle (salina). A Figura 4 mostra que as alterações na Tc dos ratos treinados injetados com salina (Fig. 5A) ou LPS (Fig. 5B) não foram diferentes ($P>0,05$) dos ratos sedentários injetados com salina ou LPS, respectivamente.

Figura 5. Decurso temporal da temperatura corporal interna (Tc) dos ratos sedentários (A) e treinados (B) mostrando os efeitos da administração sistêmica do LPS. Os índices térmicos (C e D) dos períodos basais e febris esclarecem os dados mostrados pelas barras horizontais nos painéis A e B, respectivamente. A seta indica o momento da injeção ip do LPS ou salina. Os valores são as médias $\pm$ DP. O número de animais em cada grupo é mostrado entre parênteses. * $P < 0,05$, grupos tratados com LPS vs. o respectivo grupo controle.

4.3. Efeito do exercício físico combinado ou não com o LPS na taxa de produção do H₂S na POA

Os ratos treinados tratados com LPS tiveram níveis significativamente mais elevados ($P < 0,05$) do H₂S em comparação com os outros três grupos (Fig. 6).

Figura 6. Níveis do H₂S na POA aos 120 minutos após a administração sistêmica de LPS ou salina. Sedentário salina (n = 8), sedentário LPS (n = 6), exercício salina (n = 5) e exercício LPS (n = 5). * $P < 0,05$, exercício LPS vs. os outros três grupos.

4.4. Efeito do exercício físico combinado ou não com o LPS sobre as expressões proteicas das enzimas CBS, 3-MPST e CSE na POA

As expressões das proteínas na POA dos ratos foram avaliadas por *Western blotting*. O perfil da expressão da CBS foi maior ($P < 0,05$) nos ratos treinados tratado com LPS em comparação com todos os outros grupos. Nem o treinamento e nem o LPS causaram diferença significativa nos perfis das expressões 3-MPST e CSE (Fig 7). Utilizou-se tecido renal (painel B) como controle adicional.

Figura 7. Níveis das expressões relativas das proteínas (CBS, 3-MPST e CSE) na POA aos 120 min após a administração sistêmica do LPS ou salina. O Painel A mostra as bandas representativas que refletem a intensidade do sinal de quimioluminescência para as proteínas de interesse estudadas em cada grupo experimental. O Painel B mostra a expressão relativa e a intensidade do sinal de quimioluminescência que reflete a banda da CSE e do rim de ratos, usado como controle. Os resultados são expressos como expressão relativa de CBS (C), 3-MPST (D) e CSE (E). Sedentário salina ($n = 7$), sedentário LPS ($n = 7$), exercício salina ($n = 6$) e exercício LPS ($n = 7$). * $P < 0,05$, Exercício LPS vs. Sedentário Salina e Sedentário LPS.

4.5. Efeito do exercício físico combinado ou não com o LPS nos níveis plasmáticos do TNF- α , IL-1 β e IL-6

Para investigar os efeitos do exercício físico sobre a sinalização febrigênica, avaliamos os níveis plasmáticos das citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) nos ratos treinados tratados com LPS. Utilizamos ratos sedentários como controle. Encontramos diferença estatística ($P < 0,05$) comparando o grupo sedentário LPS com os outros três grupos (Fig 8).

Figura 8. Níveis plasmáticos da TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) aos 120 min após a administração sistêmica do LPS ou salina. Sedentário Salina (n = 8), Sedentário LPS (n = 6), Exercício Salina (n = 5) e Exercício LPS (n = 5). * P < 0,05, Sedentário LPS vs. os outros três grupos.

4.6. Correlação entre o H₂S na POA e os níveis plasmáticos das citocinas

Foram observadas correlações entre a taxa de produção do H₂S na POA e os níveis plasmáticos do TNF- α ($R=0,406$; $P=0,034$) e IL-6 ($R=0,414$; $P=0,032$; Fig 9A e 9C). Nenhuma correlação foi encontrada entre H₂S e IL-1 β ($R=0,169$; $P=0,113$; Fig 9B).

Figura 9. Análises de correlação entre H₂S e TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C).

4.7. Efeito do exercício físico combinado ou não com o LPS nos níveis plasmáticos do CORT

Os ratos sedentários e treinados tratados com salina não apresentaram níveis significativos do CORT. Os grupos tratados com LPS apresentaram níveis significativamente mais elevados ($P < 0,05$) do CORT em comparação com os grupos tratados com salina. Não foram encontradas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre os grupos sedentário LPS e treinado LPS (Fig. 10).

Figura 10. Níveis plasmáticos de corticosterona aos 120 min após a administração sistêmica de LPS ou salina. Sedentário salina ($n = 8$), sedentário LPS ($n = 6$), exercício salina ($n = 5$) e exercício LPS ($n = 5$). * $P < 0,05$, Grupos tratados com LPS vs. o respectivo grupo controle.

4.8. Correlação entre H₂S na POA e níveis plasmáticos do CORT

Foi observada correlação entre a taxa de produção do H₂S na POA e os níveis plasmáticos do CORT ($R=0,167$; $P=0,047$; Fig 11).

Figura 11. Análise de correlação entre H₂S e corticosterona.

4.9. Correlação entre os níveis plasmáticos do CORT e citocinas

Observamos correlação entre o CORT e a IL-1 β ($R=0,289$; $P=0,031$; Fig 12B), mas não entre o CORT e o TNF- α ($R=0,249$; $P=0,117$; Fig 12A) e o CORT e a IL-6 ($R=0,219$; $P=0,145$; Fig 12C).

Figura 12. Análises de correlação entre corticosterona e TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C).

5. Discussão

No presente estudo, investigamos os efeitos do exercício físico sobre a taxa de produção do H₂S na POA. Além da taxa de produção endógena do gás, também foram avaliadas as expressões proteicas das enzimas responsáveis pela síntese do H₂S (CBS, 3-MPST e CSE) nessa região e sua relação com a sinalização febril durante a inflamação sistêmica. Interessantemente, o desafio imune causou um aumento acentuado da produção do H₂S e expressão da CBS na POA nos ratos treinados, mas não nos ratos sedentários. Esta resposta exacerbada nos ratos treinados contrasta com a expressiva liberação das citocinas plasmáticas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) induzidas pelo LPS (Fig. 8). De fato, as análises da correlação revelaram que a taxa de produção do H₂S na POA é inversamente proporcional aos níveis plasmáticos das citocinas, especificamente do TNF- α e da IL-6 (Fig. 9).

Quanto às limitações do presente estudo: (i) aqui especulamos que os níveis aumentados do H₂S (Fig. 6) observados nos ratos treinados tratados com o LPS estão relacionados com níveis de citocinas plasmáticas reduzidas (Fig. 8), com base em uma análise de correlação (Fig. 9). No entanto, nossos dados não fornecem a fundo uma relação entre o menor aumento induzido pelo LPS dos níveis plasmáticos das citocinas dos ratos treinados, porque não inibimos a produção do H₂S na POA; e (ii) as correlações com as expressões proteicas das enzimas CBS, 3-MPST e CSE não foram realizadas porque foram utilizados diferentes ratos.

Originalmente, pensávamos que a febre induzida pelo LPS nos ratos treinados seria atenuada. Curiosamente, nossos achados não suportam tal suposição, uma vez que a magnitude das mudanças induzidas pelo LPS na T_c dos ratos treinados *versus* sedentários foram similares (Fig. 5). Em outras palavras, o exercício físico não altera a magnitude da resposta febril ao LPS em ratos treinados

comparados com os sedentários. À primeira vista, parece que a febre seria potencializada pelo exercício físico (Fig. 5A e 5B), pois os valores mais altos da Tc (300 min após a injeção de LPS) dos ratos treinados são consideravelmente maiores do que os dos sedentários. No entanto, isso pode ser explicado pelo fato de que os valores eutérmicos basais da Tc dos ratos treinados são maiores. Esta conclusão está de acordo com o estudo de (Rowsey *et al.*, 2003) que relataram que o exercício físico está associado a uma Tc mais elevada em repouso. Este aumento da Tc basal durante a eutermia é atribuído ao aumento da produção de calor (Rowsey *et al.*, 2006).

O gás H₂S é "classicamente" conhecido como um veneno que cheira ovos podres. Desde que este gás foi originalmente considerado apenas como um gás tóxico, suas ações benéficas citoprotetoras foram ignoradas, até que foram relatadas evidências indicando que o gás age como um neuromodulador, no encéfalo de mamíferos. O H₂S é produzido endogenamente a partir da L-cisteína pelas enzimas CBS, 3-MPST e CSE. A contribuição relativa de cada uma destas enzimas na produção do H₂S centralmente é diferente. Por exemplo, são relatados que os níveis de CSE no encéfalo são particularmente baixos e, conseqüentemente, sua contribuição para a atividade neuronal é considerada insignificante em relação à CBS (a principal isoforma no SNC) e 3-MPST (Kabil *et al.*, 2011; Kimura, 2013), o que está de acordo com os nossos dados (Fig. 7).

É bem estabelecido que o LPS estimula a liberação periférica de citocinas que, em última análise, desencadeiam uma elevação da Tc (febre) mediada pelo SNC (Blatteis, 2006). Durante os últimos anos, evidências científicas tem demonstrado os benefícios à saúde decorrentes da prática regular do exercício físico

(Romeo *et al.*, 2010). No entanto, não são completamente conhecidos os mecanismos de como o exercício físico afeta o sistema imune. Tem sido proposto que o exercício físico pode ser benéfico ou prejudicial para o sistema de defesa do corpo (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Blair *et al.*, 2001). Nossos resultados mostram claramente que o exercício físico pode afetar as respostas imunes à endotoxemia, uma vez que encontramos uma redução da liberação das citocinas induzida pelo LPS nos ratos treinados, o que indica que o treinamento físico diminui consideravelmente a sinalização inflamatória (Fig. 8).

Em uma sessão aguda de treinamento físico, foi documentado aumento dos níveis de citocinas no final do treinamento, retornando aos valores basais em poucas horas (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). No presente estudo, em que os ratos foram submetidos ao treinamento físico crônico e amostras de plasma foram obtidas 24 horas após a última sessão do treinamento, verificamos que os níveis plasmáticos das citocinas não foram afetados pelo exercício físico por si só (Fig. 8), o que está de acordo com estudos anteriores com ratos corredores (Chennaoui *et al.*, 2008) e nadadores (Bonyadi *et al.*, 2009).

As citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 são consideradas mediadoras-chaves da sinalização febrigênica. Elas são sintetizadas por macrófagos e monócitos ativados em resposta ao LPS (Givalois *et al.*, 1994; Chai *et al.*, 1996). No presente estudo, verificou-se que o exercício físico atenua a liberação do TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzida pelo LPS (Fig. 8).

Especificamente, os níveis plasmáticos da IL-1 β observados foram mantidos inalterados nos ratos treinados tratados com salina enquanto que o LPS causou aumento aproximadamente 15 vezes a mais nesta citocina. Este enorme aumento

da IL-1 β induzido pelo LPS foi completamente abolido pelo treinamento físico. Nossos dados diferem de um estudo anterior que mostrou que os níveis da IL-1 β estão aumentados em ratos que voluntariamente correram em uma roda em comparação com ratos sedentários (Rowsey *et al.*, 2009). No entanto, uma tendência similar (embora não significativa) foi observada no presente estudo (Fig. 8B). Quanto ao efeito do LPS, foi relatado um nível atenuado de IL-1 β durante o choque endotóxico em ratos treinados (Chen *et al.*, 2007), o que está de acordo com o presente estudo (Fig. 8B). Quanto as outras citocinas, (Harden *et al.*, 2011), também usando a corrida voluntária na roda, observaram que o exercício não resulta na diminuição dos níveis das citocinas plasmáticas induzidas pelo LPS na dose de 250 μ g/kg. Portanto, parece plausível acreditar que não só a dose de LPS, mas também o desenho experimental precisam ser levados em consideração ao interpretar os dados.

Os níveis plasmáticos das outras citocinas, isto é, TNF- α e IL-6 não foram afetados pelo exercício físico nos ratos eutérmicos tratados com salina. Por outro lado, durante a endotoxemia, estas citocinas foram significativamente aumentadas, como a IL-1 β , e o exercício físico atenuou estes níveis plasmáticos induzidos pelo LPS (Fig. 8A e 8C). Curiosamente, a neutralização da IL-6 em ratos (Cartmell *et al.*, 2000) ou a sua ausência em camundongos (Chai *et al.*, 1996) causou febre atenuada em resposta ao LPS. A liberação de IL-6 no sangue pode ser devida à ação da IL-1 β (Luheshi *et al.*, 1996; Cartmell *et al.*, 2000), sintetizada imediatamente após a resposta febril induzida pelo LPS nos tecidos periféricos e no encéfalo, mediando à febre (Luheshi *et al.*, 1996; Cartmell *et al.*, 1999).

Portanto, não é surpreendente que um padrão semelhante nas respostas para a IL-1 β e IL-6 tenham sido observadas no presente estudo. É claro que o TNF- α desempenha um papel na resposta imune. Entretanto, sua participação pode diferir entre os desenhos experimentais. Seguindo esse contexto, (Bagby *et al.*, 1994) demonstraram que os ratos treinados tiveram menores níveis de TNF- α comparados com os ratos sedentários, após uma única sessão de exercício combinado com uma injeção do LPS. Inversamente, foi demonstrado que o treino de 12 semanas causou níveis plasmáticos aumentados de TNF- α em resposta à injeção do LPS (Criswell *et al.*, 2004). Estes achados são diferentes daqueles relatados no presente estudo, uma vez que encontramos um efeito atenuado do TNF- α em resposta ao exercício físico e ao LPS (Fig. 8A). Esta discrepância pode estar relacionada aos diferentes desenhos experimentais utilizados nos estudos, uma vez que ambos os estudos anteriores (Bagby *et al.*, 1994; Criswell *et al.*, 2004) injetaram LPS em doses mais elevadas do que a dose do presente estudo.

No entanto, estas discrepâncias mencionadas acima podem não explicar um conjunto particular de dados relacionados com os níveis de IL-1 β plasmática que foram superiores aos da IL-6 (Fig. 8). Nossos resultados diferem de alguns estudos (Krall *et al.*, 2010; Harden *et al.*, 2011), que mostraram que os níveis de IL-6 são muito mais elevados do que os da IL-1 β após a estimulação com LPS. Além disso, existem discrepâncias também em relação às concentrações mensuráveis das citocinas nas condições basal. Enquanto nós e outros (Krall *et al.*, 2010; Wrotek *et al.*, 2017) não detectamos a IL-6 em condições de controle, esta mesma citocina pode ser detectada em alguns estudos (Chennaoui *et al.*, 2008; Rowsey *et al.*,

2009). De acordo com o nosso conhecimento, reaceamos que a explicação destas discrepâncias permaneça incerta.

Outro resultado importante do presente estudo é que o exercício físico não alterou a ativação imune do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Fig. 10). Diferentes tipos de exercícios (voluntários ou forçados, por exemplo) podem ter impactos diferentes nos sistemas fisiológicos, incluindo o sistema endócrino (Wang *et al.*, 2012; Radahmadi *et al.*, 2015). O exercício físico ativa o eixo HPA resultando em alterações no CORT imediatamente após o exercício; e os níveis plasmáticos do CORT são conhecidos por afetar a Tc (Coelho *et al.*, 1992). Curiosamente, no presente estudo, o exercício físico não causou alterações significativas nos níveis plasmáticos do CORT nos ratos tratados com salina 24 horas após a última sessão do exercício (Fig. 10).

No entanto, outra razão para se avaliar o CORT é baseada no fato de que esse hormônio pode ser usado como um indicador de estresse (Inoue *et al.*, 2015). É interessante notar que o tratamento com LPS causou um aumento nos níveis plasmáticos do CORT e que este efeito foi semelhante tanto nos ratos sedentários como nos ratos treinados, indicando que o CORT pode ter afetado a febre induzida pelo LPS de forma similar nos dois grupos (Figs. 5 e 10).

O presente estudo acrescenta que a molécula gasosa H₂S produzida endogenamente na POA, como um modulador chave, não só atua na liberação das citocinas, mas também do eixo HPA. No SNC, o H₂S é sintetizado pela enzima CBS, principalmente nos astrócitos (Chen *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009). Foi reportado previamente que há uma interação recíproca entre neurônios e astrócitos (Kimura *et al.*, 2012), que também acontece nas células da POA, que são responsáveis pelo

controle da Tc durante o desafio imune (Feleder *et al.*, 2004; Blatteis, 2006). De acordo com o nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a relatar o importante papel do H₂S, produzido na POA, na atenuação da resposta da fase aguda da inflamação sistêmica em ratos treinados.

Nos ratos sedentários, foi previamente demonstrado que o H₂S atua no encéfalo como uma molécula antipirética e que a febre induzida pelo LPS é acompanhada por níveis reduzidos da taxa de produção do H₂S na POA (Kwiatkoski *et al.*, 2013). O presente estudo acrescenta evidências experimentais ao mostrar que a taxa de produção do H₂S na POA em ratos treinados tratados com LPS realmente aumentou (Fig. 6) ao invés de ser atenuada. Vale ressaltar que mostramos que a ação do H₂S, como uma molécula antipirética, parece ser, pelo menos em parte, mediada por uma importante supressão das citocinas plasmáticas (Fig. 9), além da estimulação do eixo HPA (Fig. 11). Na realidade, nossos resultados parecem apresentar boa coerência, pois a produção de H₂S na POA tem uma relação positiva (são diretamente proporcionais) com o eixo HPA, com base nos dados mostrados na Fig. 11. No entanto, limitados pelo desenho experimental utilizado, não é possível concluir se este é um efeito modulador do eixo HPA sobre a produção do H₂S na POA ou inversamente, isto é, um efeito modulador da produção do H₂S na POA sobre o eixo HPA. Quanto à última possibilidade, (Dello Russo *et al.*, 2000) testaram o efeito do H₂S na liberação do hormônio liberador da corticotropina (CRH) de explantes hipotalâmicos de ratos e encontraram que um doador do H₂S (hidrossulfeto de sódio - NaHS) não teve efeito sobre a secreção basal do CRH, mas diminuiu a liberação do CRH estimulada pelo cloreto de potássio (KCl). Para evitar eventuais efeitos tóxicos do doador, os autores provocaram aumento da produção

endógena do H₂S usando um precursor indireto da formação do H₂S (s-adenosil-metionina - SAME), que, de forma similar aos resultados obtidos com o doador, não teve efeito na função do HPA nas condições de repouso, mas inibiu o aumento de glicocorticóides relacionado ao estresse. Apesar das limitações intrínsecas a cada estudo, parece plausível concluir-se que, essencialmente, os dados indicam um desacordo com os resultados mostrados na Fig. 11. No entanto, vale ressaltar que no estudo de (Dello Russo *et al.*, 2000), a SAME foi utilizada como uma ferramenta farmacológica, em doses relativamente altas, devido à sua fraca difusão e que a SAME também é produzida endogenamente no hipotálamo, onde sua expressão gênica e a síntese proteica mostrou-se regulada pelos glucocorticosteróides (Gil *et al.*, 1997), que está de acordo com os nossos dados (Fig. 11). Além disso, utilizando uma abordagem experimental diferente envolvendo um tecido periférico, um estudo mais recente (Wang *et al.*, 2014) examinou o papel da CBS e CSE expressas nas glândulas supra-renais, sobre a manutenção da função mitocondrial e produção de glicocorticóides e concluiu que inibidores da CBS ou CSE causam disfunção e estresse oxidativo mitocondrial, resultando em uma liberação do corticosterona atenuada em resposta ao hormônio adrenocorticotrópico. Além disso, eles também observaram que esses efeitos poderiam ser atenuados por um doador do H₂S (GYY4137). Embora obtidos por diferentes abordagens, os dados observados por (Wang *et al.*, 2014) corroboram com os nossos resultados (Fig. 11). Acreditamos que são necessários mais estudos para tornar esse cenário mais claro.

Tanto o desafio imune com o LPS quanto a citocina pró-inflamatória IL-1 β são conhecidos por induzir uma série de respostas mediadas pelo SNC, incluindo a

ativação do eixo HPA (Lenczowski *et al.*, 1998). Portanto, não é surpreendente que observamos uma correlação entre IL-1 β e CORT (Fig. 12A).

Em resumo, o exercício físico é aceito como uma estratégia importante para melhorar a saúde pública. O presente estudo abordou como o exercício físico interage com o sistema imunológico avaliando a febre (marco de processos inflamatórios e infecciosos), a taxa de produção do H₂S pré-óptico, a expressão proteica das enzimas relacionadas ao H₂S (CBS, 3-MPST e CSE) e os níveis plasmáticos de citocinas e CORT. O exercício físico causou aumento da Tc basal durante a eutermia (ratos treinados). Curiosamente, a febre induzida pelo LPS pareceu estar aumentada nos ratos treinados, mas uma análise mais detalhada (avaliando as mudanças na Tc em vez de valores absolutos) revelou que na verdade a resposta febril ao LPS é semelhante entre os grupos, como também observado para o plasma do CORT (Fig. 10). Nossos dados indicam que esta resposta termorreguladora mantida em ambos os grupos é, de fato, fortemente regulada pelo H₂S na POA que é inversamente proporcional aos níveis plasmáticos das citocinas (particularmente TNF- α e IL-6 - Fig. 9A e 9C) e diretamente proporcional ao eixo HPA (Fig. 11) que parece estar relacionada com a concentração plasmática de IL-1 β (Fig. 12).

6. Conclusão

Esse estudo fornece evidências que as respostas à inflamação sistêmica são rigorosamente reguladas por meio de ajustes na produção do H₂S na POA que pode desempenhar um papel anti-inflamatório, reduzindo os níveis de citocinas plasmáticas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e potencializando a liberação de CORT. Portanto, sugere-se que os efeitos anti-inflamatórios do exercício físico são, pelo menos em parte, mediados pelo aumento da produção endógena do H₂S na POA.

7. Perspectiva

Para entender os complexos mecanismos relacionados ao efeito modulador do exercício físico durante a inflamação sistêmica, adotamos um desenho experimental que permitiu análises integradas da interação entre os sistemas nervoso, endócrino e imunológico.

O sedentarismo provoca perda de massa muscular e aumento da deposição de gordura intra-abdominal. Essa adiposidade intra-abdominal estimula a infiltração de macrófagos, causando a ativação de reações inflamatórias em cascata, resultando em inflamação sistêmica crônica. Neste cenário, a resistência à insulina, a aterosclerose e o crescimento do tumor podem ocorrer, tornando os indivíduos propensos a desenvolver diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer. Por outro lado, o exercício físico estimula a hipertrofia do músculo esquelético, melhora a oxidação da gordura, aumenta a sensibilidade à insulina e causa importantes ações anti-inflamatórias (Pedersen e Febbraio, 2012).

Deve-se levar em consideração que essas ações anti-inflamatórias são tão bem ajustadas durante a inflamação sistêmica que as mudanças na Tc (resposta febril) de ratos sedentários e treinados são praticamente idênticas e esse ajuste parece ser, pelo menos em parte, mediado pelo H₂S na POA.

8. Referências

ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **J Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 1066-71, Feb 1 1996. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8558235> >.

ABEYWARDENA, M. Y. et al. Cardiovascular biology of interleukin-6. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 15, p. 1809-21, 2009. ISSN 1873-4286 (Electronic)

1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442192> >.

BAGBY, G. J. et al. Prior exercise suppresses the plasma tumor necrosis factor response to bacterial lipopolysaccharide. **J Appl Physiol (1985)**, v. 77, n. 3, p. 1542-7, Sep 1994. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836163> >.

BLACKSTONE, E.; ROTH, M. B. Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. **Shock**, v. 27, n. 4, p. 370-2, Apr 2007. ISSN 1073-2322 (Print)

1073-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17414418> >.

BLAIR, S. N.; CHENG, Y.; HOLDER, J. S. Is physical activity or physical fitness more important in defining health benefits? **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 6, p. S379-S399, Jun 2001. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000169223200007 >.

BLATTEIS, C. M. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacol Ther**, v. 111, n. 1, p. 194-223, Jul 2006. ISSN 0163-7258 (Print)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460809> >.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Fever: How may circulating pyrogens signal the brain? **News in Physiological Sciences**, v. 12, p. 1-9, Feb 1997. ISSN 0886-1714. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000072862900001 >.

BONYADI, M. et al. The effect of regular training on plasma cytokines response in healthy and diabetic rats. **Saudi Medical Journal**, v. 30, n. 11, p. 1390-1394, Nov 2009. ISSN 0379-5284. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273458400002 >.

BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clin Infect Dis**, v. 31 Suppl 5, p. S157-61, Oct 2000. ISSN 1058-4838 (Print)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113018> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRANCO, L. G.; SORIANO, R. N.; STEINER, A. A. Gaseous mediators in temperature regulation. **Compr Physiol**, v. 4, n. 4, p. 1301-38, Oct 2014. ISSN 2040-4603 (Electronic)

2040-4603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428845> >.

BROWN, D. A. et al. Short-term treadmill running in the rat: what kind of stressor is it? **J Appl Physiol** (1985), v. 103, n. 6, p. 1979-85, Dec 2007. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17916671> >.

CARTMELL, T.; LUHESHI, G. N.; ROTHWELL, N. J. Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. **J Physiol**, v. 518 (Pt 2), p. 585-94, Jul 15 1999. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381603> >.

CARTMELL, T. et al. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. **Journal of Physiology-London**, v. 526, n. 3, p. 653-661, Aug 1 2000. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089202500018 >.

CHAI, Z. et al. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: A study on IL-6-deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 1, p. 311-316, Jan 1 1996. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996TP36500035 >.

CHEN, H. I. et al. Exercise training attenuates septic responses in conscious rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 3, p. 435-442, Mar 2007. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245084500006 >.

CHEN, X. L.; JHEE, K. H.; KRUGER, W. D. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52082-52086, Dec 10 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225493400046 >.

CHENNAOUI, M.; DROGOU, C.; GOMEZ-MERINO, D. Effects of physical training on IL-1 beta, IL-6 and IL-1ra concentrations in various brain areas of the rat. **European Cytokine Network**, v. 19, n. 1, p. 8-14, Mar 2008. ISSN 1148-5493. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262756000002 >.

COELHO, M. M.; SOUZA, G. E. P.; PELA, I. R. Endotoxin-Induced Fever Is Modulated by Endogenous Glucocorticoids in Rats. **American Journal of Physiology**, v. 263, n. 2, p. R423-R427, Aug 1992. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992JJ96000072 >.

CONTARTEZE, R. V. L. et al. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 3, p. 415-422, Nov 2008. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260665000015 >.

CRISWELL, D. S. et al. Chronic exercise and the pro-inflammatory response to endotoxin in the serum and heart. **Immunol Lett**, v. 95, n. 2, p. 213-20, Sep 2004. ISSN 0165-2478 (Print)

0165-2478 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388263> >.

DELLO RUSSO, C. et al. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: In vitro and in vivo studies in the rat (vol 12,pg 225, 2000). **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, n. 10, p. 1044-1044, Oct 2000. ISSN 0953-8194. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089331300015 >.

FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB J**, v. 16, n. 11, p. 1335-47, Sep 2002. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12205025> >.

FELEDER, C.; PERLIK, V.; BLATTEIS, C. M. Preoptic alpha(1)- and alpha(2)-noradrenergic agonists induce, respectively, PGE(2)-independent and PGE(2)-dependent hyperthermic responses in guinea pigs. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 6, p. R1156-R1166, Jun 2004. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221443600023 >.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760-765, Aug 2007. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247575500011 >.

FISCHER, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 6-33, 2006. ISSN 1077-5552 (Print)

1077-5552 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201070> >.

FLYNN, M. G.; MCFARLIN, B. K. Toll-like receptor 4: link to the anti-inflammatory effects of exercise? **Exerc Sport Sci Rev**, v. 34, n. 4, p. 176-81, Oct 2006. ISSN 0091-6331 (Print)

0091-6331 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17031256> >.

GIL, B. et al. Glucocorticoid regulation of hepatic S-adenosylmethionine synthetase gene expression. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1251-1258, Mar 1997. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WJ73900051 >.

GIVALOIS, L. et al. Temporal Cascade of Plasma-Level Surges in Acth, Corticosterone, and Cytokines in Endotoxin-Challenged Rats. **American Journal of Physiology**, v. 267, n. 1, p. R164-R170, Jul 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994NY98500073 >.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 9, p. 607-15, Aug 5 2011. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21818123> >.

GOODWIN, L. R. et al. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. **J Anal Toxicol**, v. 13, n. 2, p. 105-9, Mar-Apr 1989. ISSN 0146-4760 (Print)

0146-4760 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2733387> >.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol Behav**, v. 47, n. 5, p. 963-91, May 1990. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2201986> >.

HAAHR, P. M. et al. Effect of physical exercise on in vitro production of interleukin 1, interleukin 6, tumour necrosis factor-alpha, interleukin 2 and interferon-gamma. **Int J Sports Med**, v. 12, n. 2, p. 223-7, Apr 1991. ISSN 0172-4622 (Print)

0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1907258> >.

HARDEN, L. M. et al. Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1 beta and prostanoids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 5, p. 608-622, Jun 2011. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000291190400002 >.

HUANG, A. M. et al. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 113, n. 7, p. 803-11, Jul 2006. ISSN 0300-9564 (Print)

0300-9564 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16252072> >.

INOUE, K. et al. Long-Term Mild, rather than Intense, Exercise Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis and Greatly Changes the Transcriptomic Profile of the Hippocampus. **Plos One**, v. 10, n. 6, Jun 10 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000355979500096 >.

KABIL, O. et al. The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H₂S production in murine tissues. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 2, p. 363-72, Jul 15 2011. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21254839> >.

KAWASHIMA, H. et al. Endurance treadmill training in rats alters CRH activity in the hypothalamic paraventricular nucleus at rest and during acute running according to its period. **Life Sciences**, v. 76, n. 7, p. 763-774, Dec 31 2004. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226227500005 >.

KELLER, C. et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **FASEB J**, v. 15, n. 14, p. 2748-50, Dec 2001. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687509> >.

KIMURA, H. Hydrogen sulfide: from brain to gut. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 9, p. 1111-23, May 1 2010. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19803743> >.

_____. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. **Neurochem Int**, v. 63, n. 5, p. 492-7, Nov 2013. ISSN 1872-9754 (Electronic) 0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24036365> >.

_____. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. **Nitric Oxide**, v. 41, p. 4-10, Sep 15 2014. ISSN 1089-8611 (Electronic) 1089-8603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24491257> >.

KIMURA, H. et al. Physiological roles of hydrogen sulfide: synaptic modulation, neuroprotection, and smooth muscle relaxation. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 5-6, p. 795-803, May-Jun 2005. ISSN 1523-0864 (Print) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890027> >.

KIMURA, H.; SHIBUYA, N.; KIMURA, Y. Hydrogen Sulfide Is a Signaling Molecule and a Cytoprotectant. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, n. 1, p. 45-57, Jul 2012. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303811300005 >.

KIMURA, Y.; KIMURA, H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. **FASEB J**, v. 18, n. 10, p. 1165-7, Jul 2004. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155563> >.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol Rev**, v. 71, n. 1, p. 93-127, Jan 1991. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1986393> >.

KOMBIAN, S. B.; REIFFENSTEIN, R. J.; COLMERS, W. F. The actions of hydrogen sulfide on dorsal raphe serotonergic neurons in vitro. **J Neurophysiol**, v. 70, n. 1, p. 81-96, Jul 1993. ISSN 0022-3077 (Print)

0022-3077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395590> >.

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**, v. 298, n. 6, p. R1512-21, Jun 2010. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393159> >.

KWIATKOSKI, M. et al. Hydrogen sulfide inhibits preoptic prostaglandin E2 production during endotoxemia. **Exp Neurol**, v. 240, p. 88-95, Feb 2013. ISSN 1090-2430 (Electronic)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153577> >.

KWIATKOSKI, M. et al. Endogenous preoptic hydrogen sulphide attenuates hypoxia-induced hyperventilation. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 210, n. 4, p. 913-27, Apr 2014. ISSN 1748-1716 (Electronic)

1748-1708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24119224> >.

LEE, M. et al. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 10, p. 1523-1534, Oct 2009. ISSN 0197-4580. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269766000001 >.

LENCZOWSKI, M. J. P. et al. Individual variation in hypothalamus-pituitary-adrenal responsiveness of rats to endotoxin and interleukin-1 beta. **Molecular Mechanisms of Fever**, v. 856, p. 139-147, 1998. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077375300016 >.

LIU, E. et al. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 302, n. 12, p. R1372-83, Jun 15 2012. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513748> >.

LUHESHI, G. et al. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. **Am J Physiol**, v. 270, n. 1 Pt 1, p. E91-5, Jan 1996. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8772479> >.

LYNGSO, D.; SIMONSEN, L.; BULOW, J. Interleukin-6 production in human subcutaneous abdominal adipose tissue: the effect of exercise. **J Physiol**, v. 543, n. Pt 1, p. 373-8, Aug 15 2002. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181307> >.

MALM, C. Exercise immunology: the current state of man and mouse. **Sports Med**, v. 34, n. 9, p. 555-66, 2004. ISSN 0112-1642 (Print)

0112-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294006> >.

MATHUR, N.; PEDERSEN, B. K. Exercise as a Mean to Control Low-Grade Systemic Inflammation. **Mediators of Inflammation**, 2008. ISSN 0962-9351. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262455000001 >.

MCCLESKEY, E. W. Thermoreceptors: recent heat in thermosensation. **Curr Biol**, v. 7, n. 11, p. R679-81, Nov 1 1997. ISSN 0960-9822 (Print)

0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382796> >.

NAGASHIMA, K. Central mechanisms for thermoregulation in a hot environment. **Ind Health**, v. 44, n. 3, p. 359-67, Jul 2006. ISSN 0019-8366 (Print)

0019-8366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16922179> >.

NAGASHIMA, K. et al. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. **Auton Neurosci**, v. 85, n. 1-3, p. 18-25, Dec 20 2000. ISSN 1566-0702 (Print)

1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11189023> >.

OLSON, T. P. et al. Changes in inflammatory biomarkers following one-year of moderate resistance training in overweight women. **Int J Obes (Lond)**, v. 31, n. 6, p. 996-1003, Jun 2007. ISSN 0307-0565 (Print)

0307-0565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299382> >.

OSTROWSKI, K. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol**, v. 515 (Pt 1), p. 287-91, Feb 15 1999. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925898> >.

OSTROWSKI, K.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B. K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans - effect of intensity of exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 6, p. 512-515, Dec 2000. ISSN 1439-6319. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166055100009 >.

PEAKE, J. M. et al. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. **Exerc Immunol Rev**, v. 21, p. 8-25, 2015. ISSN 1077-5552 (Print)

1077-5552 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826432> >.

PEDERSEN, B. K. Muscle as a Secretory Organ. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 3, p. 1337-1362, Jul 2013. ISSN 2040-4603. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000324524400011 >.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1379-406, Oct 2008. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923185> >.

_____. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 8, p. 457-65, Apr 3 2012. ISSN 1759-5037 (Electronic)

1759-5029 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473333> >.

PEDERSEN, B. K.; FISCHER, C. P. Beneficial health effects of exercise - the role of IL-6 as a myokine. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 152-156, Apr 2007. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245966900003 >.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1055-81, Jul 2000. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893431> >.

PEDERSEN, B. K.; STEENBERG, A.; SCHJERLING, P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. **Journal of Physiology-London**, v. 536, n. 2, p. 329-337, Oct 15 2001. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171807700001 >.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, Apr 2005. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772055> >.

POWELL, C. R.; DILLON, K. M.; MATSON, J. B. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. **Biochem Pharmacol**, Nov 23 2017. ISSN 1873-2968 (Electronic)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29175421> >.

_____. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. **Biochem Pharmacol**, v. 149, p. 110-123, Mar 2018. ISSN 1873-2968 (Electronic)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29175421> >.

RADAHMADI, M. et al. Effect of forced exercise and exercise withdrawal on memory, serum and hippocampal corticosterone levels in rats. **Exp Brain Res**, v. 233, n. 10, p. 2789-99, Oct 2015. ISSN 1432-1106 (Electronic)

0014-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26070900> >.

RICQUIER, D. Fundamental mechanisms of thermogenesis. **C R Biol**, v. 329, n. 8, p. 578-86; discussion 653-5, Aug 2006. ISSN 1631-0691 (Print)

1631-0691 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16860276> >.

ROMANOVSKY, A. A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 1, p. R37-46, Jan 2007. ISSN 0363-6119 (Print)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008453> >.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Front Biosci**, v. 10, p. 2193-216, Sep 1 2005. ISSN 1093-9946 (Print)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970487> >.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SHIMANSKY, Y. P. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **J Appl Physiol** (1985), v. 92, n. 6, p. 2667-79, Jun 2002. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015388> >.

ROMEO, J. et al. Physical activity, immunity and infection. **Proc Nutr Soc**, v. 69, n. 3, p. 390-9, Aug 2010. ISSN 1475-2719 (Electronic)

0029-6651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569522> >.

ROWSEY, P. J. et al. Effects of exercise conditioning on thermoregulatory responses to repeated administration of chlorpyrifos. **Environ Res**, v. 92, n. 1, p. 27-34, May 2003. ISSN 0013-9351 (Print)

0013-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706752> >.

_____. Effects of chronic exercise conditioning on thermal responses to lipopolysaccharide and turpentine abscess in female rats. **Arch Toxicol**, v. 80, n. 2, p. 81-7, Feb 2006. ISSN 0340-5761 (Print)

0340-5761 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254718> >.

_____. Long-Term Exercise Training Selectively Alters Serum Cytokines Involved in Fever. **Biological Research for Nursing**, v. 10, n. 4, p. 374-380, Apr 2009. ISSN 1099-8004. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264793400008 >.

SAVAGE, J. C.; GOULD, D. H. Determination of sulfide in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr**, v. 526, n. 2, p. 540-5, Apr 6 1990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2361993> >.

SCHWIMMER, H.; GERSTBERGER, R.; HOROWITZ, M. Nitric oxide and angiotensin II: neuromodulation of thermoregulation during combined heat and hypohydration stress. **Brain Res**, v. 1006, n. 2, p. 177-89, May 1 2004. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15051521> >.

SENN, J. J. et al. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. **Diabetes**, v. 51, n. 12, p. 3391-3399, Dec 2002. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179520700006 >.

STEENSBERG, A. et al. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. **Journal of Physiology-London**, v. 537, n. 2, p. 633-639, Dec 1 2001. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172624700029 >.

STEINER, A. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BRANCO, L. G. S. Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. **Brain Research**, v. 944, n. 1-2, p. 135-145, Jul 19 2002. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177224100014 >.

STEINER, A. A. et al. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 2, p. R584-R593, Feb 2002. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173287100031 >.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Role of the preoptic carbon monoxide pathway in endotoxin fever in rats. **Brain Research**, v. 927, n. 1, p. 27-34, Feb 8 2002. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173904300004 >.

STIPANUK, M. H.; BECK, P. W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. **Biochem J**, v. 206, n. 2, p. 267-77, Aug 15 1982. ISSN 0264-6021 (Print)
0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7150244> >.

STOCKS, J. M. et al. Human physiological responses to cold exposure. **Aviat Space Environ Med**, v. 75, n. 5, p. 444-57, May 2004. ISSN 0095-6562 (Print)
0095-6562 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15152898> >.

SZABO, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 11, p. 917-35, Nov 2007. ISSN 1474-1784 (Electronic)
1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948022> >.

TANIZAWA, K. Production of H₂S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. **J Biochem**, v. 149, n. 4, p. 357-9, Apr 2011. ISSN 1756-2651 (Electronic)
0021-924X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21324981> >.

TANSEY, E. A.; JOHNSON, C. D. Recent advances in thermoregulation. **Adv Physiol Educ**, v. 39, n. 3, p. 139-48, Sep 2015. ISSN 1522-1229 (Electronic)
1043-4046 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26330029> >.

WANG, C. N. et al. CBS and CSE Are Critical for Maintenance of Mitochondrial Function and Glucocorticoid Production in Adrenal Cortex. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 16, p. 2192-2207, Dec 1 2014. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000349634000002 >.

WANG, J. et al. The impact of water-floating and high-intensity exercise on rat's HPA axis and interleukins concentrations. **Acta Physiol Hung**, v. 99, n. 3, p. 261-70, Sep 2012. ISSN 0231-424X (Print)
0231-424X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22982714> >.

WANG, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? **FASEB J**, v. 16, n. 13, p. 1792-8, Nov 2002. ISSN 1530-6860 (Electronic)
0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409322> >.

WARENYCIA, M. W. et al. Hydrogen sulfide in combination with taurine or cysteic acid reversibly abolishes sodium currents in neuroblastoma cells. **Neurotoxicology**, v. 10, n. 2, p. 191-9, Summer 1989. ISSN 0161-813X (Print)

0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2559375> >.

WROTEK, S. et al. Buthionine sulfoximine, a glutathione depletor, attenuates endotoxic fever and reduces IL-1beta and IL-6 level in rats. **Cytokine**, v. 90, p. 31-37, Feb 2017. ISSN 1096-0023 (Electronic)

1043-4666 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27764704> >.

ZOPPINI, G. et al. Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 16, n. 8, p. 543-9, Dec 2006. ISSN 1590-3729 (Electronic)

0939-4753 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126770> >.

9.1. Aprovação da comissão de ética no uso de animais

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “**Interação entre sistema imune e exercício físico**”, Protocolo nº 2015.1.973.58.7, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em reunião de 18/11/2015.

Vigência do Projeto	01/02/2016 a 02/12/2019
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	80
Peso/Idade	150 gramas / 4 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central do <i>Campus</i> USP – Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 18 de novembro de 2015.

Profa. Dra. Andíara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP