



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

BRUNA RAFAELA BEZERRA GOMES

**Avaliação do estresse nitrosativo durante a febre e a
antipirese**

Brasília, DF

2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

BRUNA RAFAELA BEZERRA GOMES

Avaliação do estresse nitrosativo durante a febre e a antipirese

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza

Brasília, DF

2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

GG633a Gomes, Bruna Rafaela Bezerra
Avaliação do estresse nitrosativo durante a febre e a
antipirese / Bruna Rafaela Bezerra Gomes; orientador
Marcelo Vale de Sousa; co-orientador Fabiane Hiratsuka
Veiga Souza. -- Brasília, 2022.
80 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Patologia Molecular) --
Universidade de Brasília, 2022.

1. LPS. 2. Óxido nítrico. 3. citoglobina. 4. paracetamol
5. dipirona. I. Sousa, Marcelo Vale de, orient. II. Souza,
Fabiane Hiratsuka Veiga, co-orient. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

- Presidente: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular
- Membro interno: Prof. Dra. Mariana de Souza Castro
Universidade de Brasília, Departamento de Ciências Fisiológicas
- Membro externo: Prof. Dr. David do Carmo Malvar
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)
- Membro externo: Prof. Dr. Renes de Resende Machado
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
- Suplente: Prof. Dra. Djane Braz Duarte
Universidade de Brasília, Departamento de Farmácia

Dedico este trabalho aos meus pais, Aroldo
e Zélia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às agências e instituições que possibilitaram o desenvolvimento desta tese: ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), à FAP/DF (Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal), e à minha casa, a Universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina.

Agradeço ao orientador, prof. Dr. Marcelo Valle por ter aceitado me orientar durante o mestrado e doutorado. Meu mais profundo agradecimento a minha co-orientadora, prof. Dra. Fabiane, pela orientação durante todo meu percurso até aqui. Agradeço por me ensinar desde o PIBIC o que é ciência, pelas discussões e ainda mais pelo respeito e apoio em todos os momentos dessa jornada. Não há palavras para descrever a admiração e gratidão por tudo.

Ao prof. Dr. Joachim Roth, a quem sempre admirei e que nos acolheu com tanta generosidade em seu laboratório durante os experimentos na visita técnica à Universidade Justus Liebig, em Giessen, Alemanha. Agradeço à Daniela Ott, a técnica espetacular do laboratório, por ensinar com tanto carinho a técnica de cultura de área pré-óptica. Em seu nome, agradeço a todos os outros integrantes do laboratório pela prazerosa convivência e pela ajuda até nas coisas simples, como fazer compras em alemão.

Agradeço ao Laboratório de Ressonância Eletrônica Paramagnética pelo uso do EPR, em nome do professor Paulo Souza, que foi fundamental nas análises e me acompanhou em muitas horas de medidas. Sou muito grata por isso e por todo o ensinamento repassado.

A todos que passaram pelo grupo de febre durante esse período – Débora, Natália, Gabriela, Ana, Marina, Jardeson, Maria Luísa, Thays, Dante, Ayane, Giovana pela ajuda nos experimentos. Um agradecimento especial a minha eterna dupla, Guilherme, por ter me indicado ao PIBIC que me fez chegar até aqui.

Agradeço a todos os professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP): Prof. Dr. Carlos André, Prof. Dr. Wagner, Profa. Dra. Mariana, Profa. Dra. Consuelo, Profa. Dra. Ana Flávia e Prof. Dr. Sébastien, Prof. Dr. Luís Henrique. Obrigada por todas as discussões, cafés na copa e momentos vividos. São todos exemplos para minha vida profissional. Agradeço também os técnicos do

laboratório: Jaques, Nuno e Antônio, que mantêm o laboratório funcionando. Também gostaria de agradecer em nome do Dr. José Jivago ao Biotério do Instituto de Biologia pelos animais cedidos e pelo cuidado com eles.

Agradeço a todos os colegas e amigos do LBQP, que fazem parte dessa grande família e com passei grande parte do meu tempo, dividindo desesperos, risadas, alegrias, almoços e vários momentos que fizeram tudo mais leve: Ana Fernanda, Débora, Farah, Giovana, Lucas, José Miguel, Marcos, Natália, Raphaela, Reynaldo, Samuel, dentre tantos outros. Dedico essa tese ainda ao nosso querido amigo Agnelo (*In memoriam*), que me fez dar um novo sentido ao que é pesquisar e do porquê fazer isso. Jamais será esquecido.

Por fim, agradeço a minha família, a quem devo todas minhas realizações. Aos meus pais, meus exemplos de vida. Aos meus irmãos, Bruno e Raphael pela torcida e apoio de sempre. Ao meu sobrinho Fernando que veio para trazer alegria nesse último ano de doutorado. Ao meu companheiro Gediel pelo companheirismo, risadas e por ter ajudado a segurar a onda nessa reta final, meu muitíssimo obrigado.

“A vida não é fácil para nenhum de nós.
Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de
tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que
somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a
qualquer custo, deve ser alcançada.”

Marie Curie

RESUMO

A febre é um importante componente da resposta inflamatória de fase aguda desencadeada quando há invasão do organismo por agentes patogênicos. Entretanto, a manutenção de temperaturas corporais elevadas pode causar efeitos deletérios ao organismo devido ao aumento da taxa metabólica, tornando necessária a terapia antitérmica. O óxido nítrico (NO) é um importante radical, que está relacionado a vários processos fisiológicos e patológicos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel do óxido nítrico durante a febre, sua influência no efeito dos antipiréticos dipirona e paracetamol e analisar o papel de proteínas relacionadas ao estresse nitrosativo no processo febril. Para isso, a concentração de NO foi quantificada no sangue por meio da HbNO e no hipotálamo, fígado e tecido adiposo marrom por meio da análise da formação do complexo Fe-DETC-NO após a administração de lipopolisacarídeo (LPS) em ratos tratados com dipirona ou paracetamol. A administração de L-arginina, precursor do NO não alterou a temperatura dos animais e tampouco o efeito dos fármacos. Em outro experimento foi feito tratamento com N6022, um inibidor da desnitrosilação. Nos animais que receberam 1mg/kg da droga antes da administração de LPS, foi verificado um aumento da temperatura em relação aos animais febris. Para investigar a relação de proteínas envolvidas no metabolismo do NO na febre, culturas primárias de células da área pré-óptica do hipotálamo foram tratadas com citoglobina, uma proteína sequestradora de óxido nítrico. O tratamento com citoglobina reduziu a concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF α e a ativação do fator de transcrição NF κ B induzidas por LPS, indicando um potencial efeito anti-inflamatório. Os dados desse trabalho sugerem que, durante a febre há uma elevação da concentração de NO tecidual e circulante e um aumento da temperatura quando a desnitrosilação é inibida, indicando um papel importante da molécula na resposta febril. O tratamento dos animais com paracetamol ou dipirona reduz a concentração de NO, entretanto seus efeitos não podem ser revertidos na presença do precursor do NO. Ressaltamos que o controle dos níveis de NO possa ser um mecanismo interessante como alvo farmacológico, já que a citoglobina demonstrou um potencial efeito anti-inflamatório e aparece regulada em animais febris.

Palavras chave: LPS, óxido nítrico, citoglobina, paracetamol, dipirona, febre.

ABSTRACT

Fever is an important component of the acute phase inflammatory response triggered when there is invasion of the organism by pathogenic agents. However, maintaining high body temperatures can cause deleterious effects on the body due to increased metabolic rate, making antipyretic therapy necessary. Nitric oxide is a radical, which is related to several physiological and pathological processes. In this sense, the objective of this work was to investigate the role of nitric oxide during fever, its influence on the effect of the antipyretics dipyrrone and acetaminophen, and also to analyze the role of proteins related to nitrosative stress in fever. For this, the concentration of NO was measured in blood through HbNO, and in the hypothalamus, brown adipose tissue and liver by Fe-DETC-NO complex formation after the administration of lipopolysaccharide (LPS) and in rats treated with dipyrrone or paracetamol. The administration of L-arginine, a precursor of NO, did not change the temperature of the animals or the effect of the drugs. In another experiment, treatment was performed with N6022, a denitrosylation inhibitor. In animals that received 1mg/kg of the drug before LPS, an increase in temperature was observed in relation to febrile animals. To investigate the relationship of proteins involved in NO metabolism in fever, primary cultures of cells from the preoptic area of the hypothalamus were treated with cytoglobin, a protein described as a nitric oxide scavenger. Cytoglobin treatment reduced LPS-induced pro-inflammatory cytokine IL-6 and TNF α and NF κ B activation, indicating a potential anti-inflammatory effect. The data from this work suggest that, during fever, there is an increase in tissue and circulating NO concentration and an increase in temperature when denitrosylation is inhibited, indicating an important role of this molecule in the febrile response. The treatment of animals with acetaminophen or dipyrrone reduces the concentration of NO, however its effects cannot be reversed in the presence of the NO precursor. We emphasize that the control of NO levels may be an interesting mechanism as a pharmacological target, since cytoglobin demonstrated a potential anti-inflammatory effect and appears to be regulated in febrile animals.

Keywords: LPS, nitric oxide, cytoglobin, acetaminophen, dipyrrone, fever.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C – graus Celsius
ΔT_c – diferença da temperatura corporal
4-AA – 4-amino-antipirina
4-MAA – 4 metil-amino-antipirina
AINES – anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA – análise de variância
APOHA – área pré-óptica do hipotálamo anterior
ASC – Área sob a curva
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
CEUA – Comitê de Ética no Uso Animal
CoA – Coenzima A
COX – ciclooxigenase
cGMP – guanosina monofostato cíclico
cPLA₂ – fosfolipase A₂ citosólica
Cygb – citoglobina
Cys – cisteína
DETC - dietilditiocarbamato
Dip – dipirona
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
EP – receptor de prostaglandina
EPM – erro padrão da média
EPR – Espectroscopia de ressonância paramagnética
ERN – espécies reativas de nitrogênio
GSH –glutationa
GSNO – nitrosoglutationa
GSNOR – nitrosoglutationa redutase
GTP – guanosinatrifosfato
HbNO – hemoglobina nitrosilada
His – histidina

i.c.v. – intracerebroventricular
i.p. – intraperitonal
i.v. – intravenosa
IL – Interleucina
IL-1R1 – receptor de interleucina do tipo 1
iNOS – óxido nítrico sintase induzida
KC – *Kupffer cell*
LA – L-arginina
L-NAME - *N-Nitroarginine methyl ester*
LPS – lipopolissacarideo
Min - minutos
MnPO – área pré-óptica medial
mPGES-1 – PGE sintase microssomal-1
NADPH – adenina nicotinamina dinucleotídeo fosfato
NFκB – fator nuclear kappa B
NF-IL6 - fator nuclear para IL-6
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
PACAP – polipeptídeo ativador da adenilado ciclase da hipófise
PAMP – padrão molecular associado a patógenos
Para – paracetamol
PCR – reação em cadeia polimerase
PLA₂ – fosfolipase A₂
PG – prostaglandina
POA – *preoptic area*
PTM – modificação pós-traducional
RANK – Receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RANKL- Ligante de RANK
ROS – *reactive oxygen species*
s.c. – subcutânea
sCG – guanilato ciclase solúvel
SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*
SNC – sistema nervoso central

SNO – S-nitrosilação

SNO - CoA – S-nitroso Coenzima A

SNO - CoAR – S-nitroso Coenzima A redutase

STAT3 – *signal transducer and activator of transcription 3*

TAM – tecido adiposo marrom

Tc – temperature corporal

TLR – receptor Toll-like

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

Trx – tireoredoxina

TrxR – tireoredoxina redutase

UCP- Uncoupling proteins; Proteínas desacopladoras

Veí – Veículo

VMPO – área pré-óptica ventromedial

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo I

Tabela 1: Respostas fisiológicas e comportamentais ativadas por termorreceptores.....	17
Figura 1: Indução da febre durante a infecção.....	21
Figura 2: Inibição da síntese de PGE ₂ promovida por AINES.....	25
Figura 3: Representação esquemática da biossíntese de NO a partir da L-arginina.....	27
Figura 4: Estruturas primária e terciária da citoglobina.....	29
Figura 5: Sistemas de controle enzimático da S-nitrosilação.....	31

Capítulo II

Figura 6: Concentração de HbNO no sangue de ratos febris e após tratamento com diferentes drogas antipiréticas.....	41
Figura 7: Espectro típico do complexo Fe-DETC-NO.....	42
Figura 8: Concentração do complexo Fe-DETC-NO em diferentes tecidos de animais tratados com dipirona ou paracetamol.....	43
Figura 9: Evolução temporal da temperatura corporal de ratos após tratamento com dipirona e injeção de LPS e Fe-DETC.....	44
Figura 10: Evolução temporal da temperatura corporal de ratos após tratamento com paracetamol e injeção de LPS e FeDETC.....	45
Figura 11: Efeito da administração de L-arginina (LA) na temperatura corporal de ratos e na concentração de HbNO.....	46
Figura 12: Efeito da administração de L-arginina (LA) na temperatura corporal e na concentração de HbNO de ratos tratados com antipiréticos.....	47
Figura 13: Efeito da administração de N6022 na temperatura corporal de ratos febris.....	48

Capítulo III

Figure 1: Cytoglobin (Cygb) expression is increased in rat hypothalamus after intravenous injection of lipopolysaccharide (LPS).....	57
Figure 2: LPS-induced tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) and interleukin-6 (IL-6) concentrations in supernatants of rat preoptic area (POA) primary cultures under the influence of Cygb.....	57
Figure 3: Cygb does not affect the nuclear NF-IL6 and STAT3 immunoreactivity in microglia and astrocytes, respectively.....	58

Figure 4: Nuclear factor-kB (NF-kB) immunoreactivity in microglia in the primary microculture of rat POA in the response of stimulation of LPS and treatment with Cygb.....59

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xii
SUMÁRIO.....	xiv
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	16
CAPÍTULO I	17
1.1. INTRODUÇÃO	18
1.1.1. BASES FISIOLÓGICAS DA FEBRE.....	18
1.1.1.1. Citocinas e fatores de transcrição relacionados à febre.....	22
1.1.2. TERAPIA ANTIPIRÉTICA	24
1.1.3. ÓXIDO NÍTRICO.....	27
1.1.4. PROTEÍNAS RELACIONADAS AO ESTRESSE NITROSATIVO E A FEBRE.....	28
1.2. OBJETIVOS	32
1.2.1. OBJETIVO GERAL.....	32
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
CAPÍTULO II: Influência do óxido nítrico na febre e na antipirese promovida por dipirona e paracetamol.....	33
2.1. INTRODUÇÃO	34
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.2.1. ANIMAIS.....	36
2.2.2. MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DOS RATOS	36
2.2.3. EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS	37

2.2.3.1. Indução de febre e tratamento com antipiréticos.....	37
2.2.3.2. Obtenção de amostra para espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)	37
2.2.3.3. Tratamento com doadores de NO	38
2.2.3.4. Tratamento com inibidor de GSNOR.....	38
2.2.4. PREPARO DE AMOSTRAS PARA MEDIDAS DE EPR	39
2.2.5. MEDIDAS DE EPR	39
2.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
2.3. RESULTADOS	40
2.3.1. CONCENTRAÇÃO DE NO DURANTE A FEBRE INDUZIDA POR LPS E NA ANTIPIRESE	40
2.3.2. EFEITO DO COMPLEXO FE-DETC NA TEMPERATURA CORPORAL DE RATOS	43
2.3.3. EFEITO DA L-ARGININA, PRECURSOR DE NO SOBRE A FEBRE E A ANTIPIRESE	45
2.3. DISCUSSÃO	48
2.4. CONCLUSÃO.....	53
CAPÍTULO III: <i>Cytoglobin attenuates neuroinflammation in lipopolysaccharide-activated primary preoptic area cells via NF-κB pathway inhibition</i>	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	76
ANEXO 1: APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL	77
ANEXO 2: PRORROGAÇÃO DE PRAZO – CEUA	78
PRODUÇÃO DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO	79

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Devido à diversidade de temas abordados nesta tese, ela foi dividida em capítulos para possibilitar uma leitura mais dinâmica. Inicialmente, no **Capítulo I** apresentamos uma breve revisão da literatura com os temas abordados no trabalho. Ainda no capítulo I apresentamos os objetivos – geral e específicos, que serão elucidados no decorrer da tese.

Nos capítulos seguintes (Capítulo II e III) apresentamos os resultados dos experimentos realizados durante o período do doutorado. O **Capítulo II** trata de um esboço de manuscrito, abordando o tema: “Influência do óxido nítrico na antipirese promovida por dipirona e paracetamol”, com dados ainda não publicados. Já o **Capítulo III** traz o trabalho “*Cytoglobin attenuates neuroinflammation in lipopolysaccharide-activated primary preoptic area cells via NF- κ B pathway inhibition*”, já publicado na revista *Frontiers in Molecular Neuroscience*.

Finalizamos a tese apresentando as **Considerações finais e perspectivas**, fazendo uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos e as perspectivas de futuros experimentos e trabalhos que possam surgir a partir dos resultados obtidos na presente tese.

As **Referências Bibliográficas** contêm as referências dos trabalhos citados nos Capítulos I, II e considerações finais.

Nos **Anexos** apresentamos as declarações de aprovação pelo comitê de ética no uso animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da UnB e a lista de participação em eventos e artigos publicados durante o período de doutorado.

CAPÍTULO I

Referencial teórico

1.1. INTRODUÇÃO

1.1.1. BASES FISIOLÓGICAS DA FEBRE

Os organismos possuem diversos mecanismos de regulação da homeostase, dentre eles o controle da temperatura. A manutenção da temperatura corporal é fundamental para que se tenha uma condição adequada para o funcionamento celular e, conseqüentemente, da própria vida (Morrison e Nakamura, 2019). Os mamíferos endotérmicos têm a capacidade de regular sua própria temperatura, utilizando fatores internos e externos para que se mantenha a temperatura corporal adequada, que é cerca de 36,6 °C em humanos e 36,5 °C em ratos (Gordon, 1990; Protsiv *et al.*, 2020; Tansey e Johnson, 2015).

Em situações nas quais há alteração da temperatura ambiental, diferentes comportamentos termorregulatórios são evocados, elevando a temperatura corporal quando há um estímulo frio ou diminuindo-a em situações de calor. Na tabela abaixo, são descritos os mecanismos desencadeados no organismo, permitindo assim a manutenção da temperatura corporal, e os respectivos efetores de cada uma dessas ações.

Tabela 1: Respostas fisiológicas e comportamentais ativadas por termorreceptores.

Estímulo	Efetores	Respostas
Aumento da temperatura corporal	Vasos sanguíneos	Vasodilatação
	Glândulas sudoríparas	Sudorese
	Sistema endócrino	Redução da taxa metabólica (glândulas adrenal e tireoide)
	Comportamento	Redução da atividade, posição corporal ereta, perda do apetite
Redução da temperatura corporal	Vasos sanguíneos	Vasoconstrição
	Músculos piloerectores	Piloereção
	Músculos esqueléticos	Termogênese por tremor
	Sistema endócrino	Aumento da taxa metabólica (glândulas adrenal e tireoide e tecido adiposo marrom)
	Comportamento	Atividade aumentada, posição corporal curvada e aumento do apetite
	Tecido Adiposo Marrom	Termogênese independente de tremor

Adaptado de: (Tansey e Johnson, 2015).

Todas essas respostas são controladas pelo hipotálamo, mais precisamente pela área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOHA). Essa região do encéfalo integra todos os sinais dos termorreceptores das vias aferentes e então ativa as diferentes vias eferentes que controlam as respostas fisiológicas e comportamentais para a manutenção da temperatura (Tan e Knight, 2018).

Na APOHA estão presentes neurônios termossensíveis, identificados primeiramente por meio dos experimentos clássicos de eletrofisiologia de Nakayama e colaboradores na década de 1960, em que os autores demonstraram que esses neurônios podem ser caracterizados como sensíveis ao frio ou ao calor pela frequência do potencial de ação, que varia de acordo com a temperatura local (NAKAYAMA *et al.*, 1963; revisado por BOULANT, 2000).

Estudos utilizando abordagens genéticas demonstraram que ambientes quentes induzem a expressão de c-Fos na região da APOHA, incluindo a área pré-óptica ventromedial (VMPO) a área pré-óptica medial (MnPO), que correspondem às áreas onde a prostaglandina E₂ (PGE₂) – principal prostanóide envolvido na febre – atua, indicando que essas células c-Fos positivo são fundamentais para a termorregulação (Bachtell, Tsivkovskaia e Ryabinin, 2003; Tan e Knight, 2018). Além disso, Tan e colaboradores (2016) realizaram a identificação molecular dos neurônios sensíveis ao calor, por meio de técnicas de edição gênica, demonstrando que, em ratos expostos ao calor ambiente (37°C), há a ativação de uma subpopulação de neurônios que co-expressam o polipeptídeo ativador da adenilatociclase da hipófise (PACAP) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

A febre pode ser definida como um estado em que a temperatura corporal está aumentada, o que ocorre na maioria das vezes na resposta do hospedeiro à invasão por micro-organismos ou outras substâncias patogênicas (IUPS Thermal Commission, 2003).

O aumento da temperatura durante a resposta inflamatória de fase aguda é importante para uma maior sobrevivência do hospedeiro. Alguns patógenos microbianos são sensíveis a temperatura na faixa febril, e ainda, temperaturas mais elevadas podem auxiliar os mecanismos da resposta imune, como por exemplo, facilitar a infiltração de neutrófilos (Hasday, Fairchild e Shanholtz, 2000). Entretanto, cabe salientar que o papel benéfico da febre ainda levanta discussão na literatura em

relação ao seu potencial deletério, que ocorre principalmente quando a temperatura corporal atinge valores maiores que 40°C em humanos (Blatteis, 2003).

As alterações de temperatura promovidas pelo hipotálamo são mediadas pela sinalização por pirógenos em um mecanismo regulado por fatores de transcrição, citocinas e outros mediadores pró e anti-inflamatórios. Diferentes substâncias podem desencadear o processo febril. Se a origem dessas substâncias for externa ao organismo as chamamos de pirógenos exógenos, que podem ser infecciosas, como vírus, bactérias ou fungos; ou não infecciosas, como é o caso de agentes inflamatórios, antígenos e medicamentos (Roth e Blatteis, 2014). Há ainda os chamados pirógenos endógenos, como por exemplo, a interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF) e interferons, produzidos pelo organismo e que são capazes de induzir febre (El-Radhi, 2018).

Em modelos experimentais, a febre é comumente induzida pela administração de lipopolissacarídeo (LPS), um pirógeno exógeno de origem bacteriana. A injeção intravenosa (i.v.) de LPS provoca aumento da temperatura, com um perfil que depende da temperatura ambiente e da dose. Na zona de termoneutralidade de ratos (27 a 28 °C), doses de LPS na faixa de 5 - 1000 µg/kg, i.v. promovem respostas febris caracterizadas por baixa latência (aproximadamente 10 min), seguida de picos que ocorrem 1, 2.5 e 5 horas após a administração (Garami, Steiner e Romanovsky, 2018).

Na Figura 1 está ilustrado o mecanismo de indução da febre a partir do reconhecimento de um padrão molecular associado a patógenos (PAMP), como é o caso do LPS. Resumidamente, o LPS é reconhecido por um receptor *Toll-like* (TLR) ou outros receptores de reconhecimento de padrões que ativam células dendríticas e macrófagos. Essas células liberam citocinas pirogênicas como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral que atuam sistemicamente para induzir a febre. O principal mecanismo envolve a ativação de receptores por essas citocinas, tais como o receptor de interleucina tipo 1 (IL-1R) e o receptor de interleucina tipo 6 (IL-6R), presentes nas células endoteliais vasculares em regiões próximas a APOHA, induzindo a expressão de ciclo-oxigenase (COX)-2, a principal enzima responsável pela síntese de PGE₂ (Evans, Repasky e Fisher, 2015).

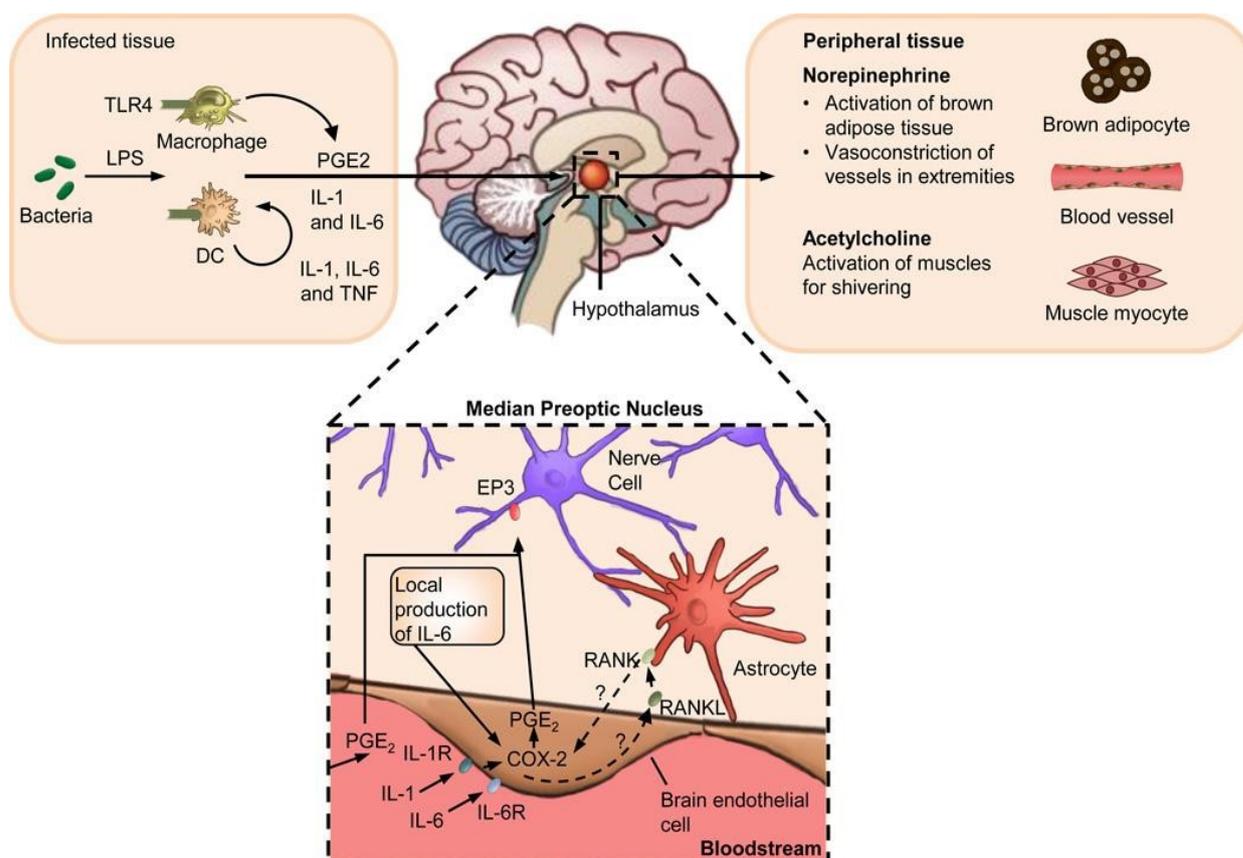


Figura 1: Indução da febre durante a infecção. Fonte: (Evans, Repasky e Fisher, 2015).

A PGE_2 é considerada o mediador final da febre, pois inibe os neurônios sensíveis ao calor da APOHA promovendo a termogênese e a retenção de calor (Boulant, 2000; Duan e Xu, 2019). Ela é sintetizada por macrófagos e células endoteliais através da via do ácido araquidônico, onde a fosfolipase A_2 citosólica ($cPLA_2$) libera o ácido araquidônico esterificado dos fosfolípidos das membranas celulares, que é então metabolizado pela $COX-2$ formando a PGG_2 , que é oxidada pela mesma enzima dando origem então a PGH_2 . Pela ação da PGE sintase microssomal-1 (mPGES-1), uma isomerase, a PGH_2 é convertida em PGE_2 (Flower, 2003). O efeito promovido pela PGE_2 se dá pela ligação da substância a receptores acoplados a proteína G do subtipo EP, que são divididos em 4 grupos – EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4 . Os receptores EP_3 presentes nos neurônios da APOHA são apontados como os principais receptores envolvidos na resposta febril (Nakamura *et al.*, 2005). Desde o desenvolvimento de camundongos nocaute para cada receptor EP, assim como drogas agonistas e antagonistas seletivos, vêm se demonstrando que é esse o subtipo responsável pelo desenvolvimento da resposta febril, já que camundongos nocaute para o receptor EP_3 não desenvolvem febre (Roth *et al.*, 2009; Tsuge *et al.*,

2019). Osaka (2022) demonstrou que a administração central do agonista do receptor EP₄ gerou uma resposta febril semelhante a resposta da PGE₂ e seu antagonista atenuou a febre induzida por PGE₂, indicando que esse receptor também é importante para a resposta febril. Entretanto, estudos anteriores utilizando animais nocaute haviam demonstrado que o receptor EP₄ induz hipotermia (Ushikubi *et al.*, 1998; Oka, 2004).

1.1.1.1. Citocinas e fatores de transcrição relacionados à febre

A interação de PAMPs com os TLRs desencadeia a sinalização intracelular, levando à transcrição de genes que codificam proteínas solúveis da imunidade inata, incluindo as citocinas pirogênicas, principalmente IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Essas citocinas agem de maneira interligada e podem ser reguladas por um mecanismo complexo que envolve hormônios, fatores de transcrição, entre outros mediadores (Prajitha, Athira e Mohanan, 2019).

A IL-1 é um potente mediador da febre, dor e inflamação, produzida por monócitos e macrófagos. A administração de IL-1 β promove o aumento da temperatura em ratos, enquanto a administração do antagonista do seu receptor inibe a febre induzida pelo LPS. Animais nocaute para o IL-1R1 apresentam um padrão de febre induzida por LPS mais brando (Harden *et al.*, 2008; Matsuwaki *et al.*, 2017). A IL-6 também é outro importante mediador da resposta inflamatória, sendo que no sistema nervoso central (SNC) é sintetizada por células da glia e neurônios e apresenta um papel neuromodulador em diferentes funções cerebrais (Conti, 2004). Na febre induzida por *Escherichia coli*, a administração de anticorpo anti-IL-6 atenua variação de temperatura dos animais (Martins *et al.*, 2012). Foi demonstrado também que a co-administração de homólogos das duas citocinas apresenta efeito sinérgico aumentando a temperatura, sugerindo que elas atuam em conjunto para produzir o efeito pirogênico (Harden *et al.*, 2008).

Outro pirógeno endógeno relatado é o TNF α , o principal mediador inflamatório em resposta a bactérias Gram-negativas (Conti, 2004). Na febre o papel do TNF α não é completamente elucidado. Sua administração central leva ao aumento da temperatura corporal em ratos (Yamashiro, Souza, e Melo Soares, 2019) e o tratamento de animais com antagonistas do TNF reduz a temperatura corporal, sugerindo um importante papel pirogênico da substância (Ross *et al.*, 2003). Por

outro lado, já foi demonstrado que a injeção sistêmica de TNF α atenua a febre induzida por IL-1 (Long *et al.*, 1992), e que a administração sistêmica de anticorpos contra TNF promoveu elevação da sua temperatura (Long *et al.*, 1990), indicando que o TNF possa atuar como um antipirético endógeno.

Essas citocinas são produzidas no hipotálamo e em outras estruturas via fatores de transcrição inflamatórios, incluindo entre os mais importantes o fator nuclear kappa B (NF κ B), o fator nuclear para IL-6 (NF-IL6) e o *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3). Esses fatores também regulam a transcrição da COX-2 e da mPGES-1, que são as enzimas relacionadas a síntese de PGE₂. (Rummel, 2016).

O NF κ B é um dos fatores de transcrição inflamatórios mais estudados. Na febre é ativado por IL-1 β e TNF α e camundongos nocaute para o gene não desenvolvem febre induzida por LPS (Kozak, Wrotek e Kozak, 2006). No curso da resposta febril, o NF κ B é o primeiro fator de transcrição detectável, o que indica seu papel crucial na gênese da febre (Rummel, 2016). Lee e colaboradores (2003) sugeriram que a inibição desse fator de transcrição pode ser um alvo na terapia antitérmica, já que o uso de inibidores reduz a febre diminuindo os níveis de IL-6, TNF α e IL-1.

A ativação do STAT3 no encéfalo durante inflamação induzida pelo LPS é mediada pela IL-6. Usando modelo de camundongos com deleção de STAT3 nas células endoteliais, Eskilsson e colaboradores (2014) confirmaram o papel de STAT3 ativada por IL-6 na produção de PGE₂ durante a febre, o que reforça o importante papel do endotélio cerebral na comunicação do sistema imune e o encéfalo durante a inflamação (Rummel, 2016). Um dos fatores de transcrição responsável pela expressão da IL-6 é o NF-IL6. A ativação do fator no cérebro durante a inflamação mediada por citocinas em modelos *in vivo* ainda permanece desconhecida, apesar da confirmação de que no hipotálamo, a expressão de IL-6 induzida pelo LPS é mediada por NF-IL6 (Schneiders *et al.*, 2015). O papel do NF-IL6 na neuroinflamação envolve a indução de PGs e efeitos neurotóxicos na micróglia (Rummel, 2016).

Apesar da febre ter sido reconhecida como um sintoma da doença desde Hipócrates, nos séculos V e IV a.C. e que haja relatos do uso de terapia antipirética desde o Egito Antigo, os mecanismos envolvidos na gênese e manutenção do

processo febril não estão completamente elucidados, o que conseqüentemente dificulta o entendimento e desenvolvimento de novas terapias para o seu tratamento, já que os medicamentos disponíveis não são completamente seguros e muitos pacientes apresentam intolerância ao tratamento, sendo assim contra-indicados em diversas situações.

1.1.2. TERAPIA ANTIPIRÉTICA

A febre exerce um importante papel no processo inicial do mecanismo de defesa do nosso corpo, entretanto, caso seja persistente por longos períodos ou nas situações em que a temperatura está muito elevada, ela pode levar a efeitos deletérios (Hasday, Fairchild e Shanholtz, 2000; Prajitha, Athira e Mohanan, 2019). Nesses casos é necessário o uso de terapia antitérmica.

Para conter os efeitos nocivos provocados pelas citocinas inflamatórias, o próprio organismo apresenta mecanismos de controle endógenos. Entre esses mecanismos podemos citar a produção de citocinas anti-inflamatórias, internalização de receptores de endotoxinas, e a produção de substâncias antagonistas das citocinas inflamatórias. Dentre as principais citocinas, a IL-10 é considerada a que tem a maior atividade antipirética, já que inibe a produção de TNF, IL-1 e IL-6 além de aumentar a expressão do antagonista solúvel de IL-1 (Prajitha, Athira e Mohanan, 2019). Além dos antipiréticos endógenos conhecidos, podem existir diferentes substâncias endógenas com potencial antipirético ainda não elucidado.

Em se tratando de fármacos antipiréticos exógenos, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são comumente utilizados na terapia antitérmica. Esses medicamentos têm como efeitos, além da redução da febre, o controle da dor e da inflamação. A propriedade antipirética desses medicamentos está principalmente relacionada com a habilidade de impedir a síntese de PGs, por meio da inibição da COX-1 e/ou COX-2 (Figura 2).

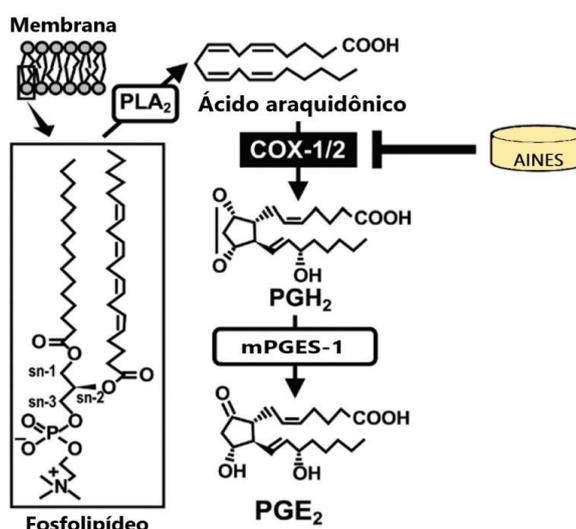


Figura 2: Inibição da síntese de PGE₂ promovida por AINES. O ácido araquidônico, um substrato da COX, é liberado pelo PLA₂ a partir dos fosfolípidios da membrana. O ácido araquidônico livre é metabolizado pela COX-1/2 em PGH₂, que é então convertido pela mPGES-1 em PGE₂, ativando os receptores EP₃, responsável por transmitir os sinais para que os mecanismos de geração e conservação do calor sejam ativados. Os AINES exercem ações anti-inflamatórias pela inibição da atividade da COX e, assim, pela supressão da biossíntese de PGE₂. Adaptado de: (Tsuje *et al.*, 2019).

No Brasil, medicamentos como o paracetamol e a dipirona, estão entre os mais comercializados (SCMED, 2021). Estes fármacos não apresentam efeito anti-inflamatório e possuem baixa toxicidade gastrointestinal, indicando um mecanismo de ação diferente da inibição das COX (Graham *et al.*, 2013; Malvar *et al.*, 2011). Apesar do disseminado uso desses medicamentos, ainda não há consenso sobre o modo de ação desses fármacos durante a resposta febril.

A dipirona é uma droga analgésica e antitérmica que no organismo é rapidamente hidrolisada em seus metabólitos ativos: o 4-metil-amino-antipirina (4-MAA) e o 4-aminoantipirina (4-AA). São esses metabólitos os responsáveis pelo efeito antipirético na febre induzida pelo LPS (Malvar *et al.*, 2014). Em modelos animais, o tratamento com dipirona reduz a febre induzida por LPS, IL-1 β , IL-6 e TNF α , mas não altera a febre induzida pelo ácido araquidônico, o que demonstra que sua ação é independente da inibição desta via (SOUZA *et al.*, 2002). Os metabólitos da dipirona inibem a síntese de PGE₂ no hipotálamo e no fluído cerebrospinal de ratos, mas apresentam também efeitos em febres independentes de PGE₂, o que sugere que a dipirona pode exercer seus efeitos por diferentes vias ainda não elucidadas (Malvar *et al.*, 2011, 2014).

O paracetamol, um dos fármacos mais utilizados mundialmente, assim como a dipirona não têm seus mecanismos de ação completamente caracterizados. Estudos apontam que o paracetamol apresenta seletividade para COX-2, entretanto, devido a sua baixa atividade anti-inflamatória, esta não deve ser a sua principal via de ação (Hinz, Cheremina e Brune, 2008; Li *et al.*, 2008). Em contrapartida, estudo mais recente utilizando camundongos nocaute para COX-1 apontou que a atividade antipirética do fármaco é mediada pela inibição de uma enzima variante da COX-1 (Ayoub e Flower, 2019). Considerando os dados divergentes, são necessários mais estudos para apontar um potencial mecanismo de ação pelo qual os fármacos com atividade antipirética exercem seus efeitos.

Apesar de serem bastante utilizados, os medicamentos usados na terapia antipirética não são totalmente seguros. No tratamento com AINES, a queixa mais comum é a toxicidade gastrointestinal, sendo relatado pelos pacientes sintomas como anorexia, náuseas, dispepsia e formação de úlceras gástricas e intestinais. Além disso, pode ocorrer nefropatia, eventos adversos relacionados ao sistema nervoso central e cardiovascular. Alguns indivíduos apresentam ainda hipersensibilidade ou mesmo resistência a essa classe de medicamentos (Brunton *et al.*, 2010). Além do mais, esses medicamentos são contra-indicados em casos de dengue, doença endêmica no Brasil, devido a inibição da síntese de tromboxano A₂ (TXA₂), aumentando o risco de hemorragia (Brunton *et al.*, 2010).

O uso de paracetamol nas doses terapêuticas apresenta poucos efeitos adversos, como exantema e outras reações alérgicas. Mas deve-se ressaltar que a ingestão de doses supratrapêuticas produz toxicidade importante, tendo como efeito adverso necrose hepática, que pode ser fatal. Além do mais, estudos recentes indicam que o uso de paracetamol na gestação pode estar associado a efeitos adversos no nascimento, como por exemplo, baixo peso ao nascer e parto prematuro (Baker *et al.*, 2022; Eslamimehr *et al.*, 2022).

A dipirona é um medicamento proibido em países como os Estados Unidos da América, Reino Unido e nos países escandinavos devido ao risco de agranulocitose, que apesar de ser uma reação rara, é potencialmente fatal. Também são relatados efeitos adversos como choque anafilático e *rash* quando usado em pacientes pediátricos (Zahn *et al.*, 2022).

Devido aos efeitos adversos e intolerância aos tratamentos disponíveis no mercado, o estudo de alvos terapêuticos que possam estar envolvidos com a

resposta febril e a antipirese é necessário, pois possibilitaria o desenvolvimento de novos fármacos, com o objetivo de melhorar a adesão ao tratamento.

1.1.3. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um gás que inicialmente foi descrito como um fator de relaxamento derivado do endotélio, mas que desde então, tem sido associado a outras funções. Nos organismos, o NO atua como uma molécula de sinalização gasosa que regula diversas respostas fisiológicas e patológicas. Dentre as respostas fisiológicas mediadas pelo NO podemos citar o controle da pressão arterial, da agregação plaquetária, defesa do hospedeiro e neurotransmissão no SNC e nervos periféricos (Korhonen *et al.*, 2005).

A síntese de NO em mamíferos ocorre por meio das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), que convertem L-arginina e oxigênio em L-citrulina e NO através de uma complexa reação de oxirredução (Figura 3). São reportadas três isoformas de NOS, codificadas por diferentes genes: uma NOS neuronal (nNOS) codificada pelo gene NOS1, uma NOS induzida (iNOS) codificada por NOS2 e outra endotelial (eNOS) codificada por NOS3. A nNOS e a eNOS são enzimas constitutivas, dependentes de cálcio (Ca^{2+}), e reguladas por mecanismos transcricionais, pós-transcricionais (como microRNA) ou ainda pós-traducionais (como fosforilação, acetilação, S-nitrosilação). Já a iNOS é uma enzima regulada através da transcrição gênica apenas em situações inflamatórias ou no estresse oxidativo (Farah, Michel e Balligand, 2018). A iNOS tem atividade catalítica de 100 a 1000 vezes maior que as enzimas constitutivas, além de ser a única das três isoformas que é independente de Ca^{2+} (MacMicking, Xie e Nathan, 1997).

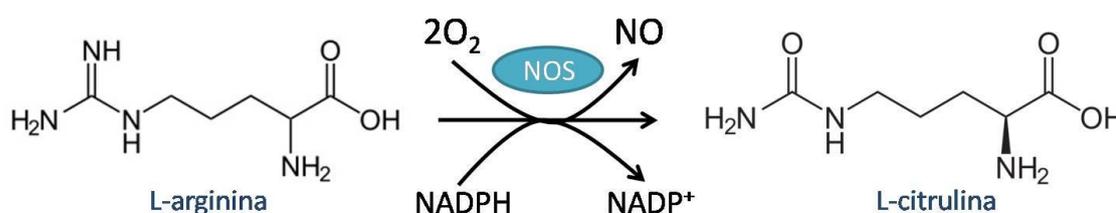


Figura 3: Representação esquemática da biossíntese de NO a partir da L-arginina.

Devido à sua estrutura química, o NO atua como um doador de elétrons que podem reagir com metais de transição, o que resulta na formação de complexos nitrosilo. Um dos principais alvos do NO como molécula sinalizadora é a guanilato ciclase solúvel (sGC), uma enzima que contém um grupamento heme que tem como função converter guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP), uma importante molécula de sinalização intracelular (Korhonen *et al.*, 2005).

Apesar de participar de inúmeras funções fisiológicas no organismo, o NO pode estar relacionado também ao surgimento de diversas patologias, já que reage com outras moléculas formando produtos potencialmente tóxicos para o organismo (Cristiana, Nina e Ele, 2012).

O estresse nitrosativo é estabelecido quando o organismo é exposto a uma alta concentração de NO. Sabe-se que o NO pode reagir rapidamente com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) formando peroxinitrito ($ONOO^-$), uma molécula altamente reativa, que ocasiona danos ao DNA, proteínas e lipídeos (Kumar, Singh e Bhardwaj, 2017; Pacher, Beckman e Liaudet, 2007).

Embora seja observado um grande interesse na literatura pelo estudo do NO, os efeitos do estresse nitrosativo em diversas patologias ainda são pouco compreendidos. Já é relatado o envolvimento das Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) em doenças cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólica, artrite reumatóide e doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla) (Minhas, Bansal e Bansal, 2020). As ERN podem levar a uma ativação excessiva de substâncias inflamatórias, como por exemplo, $TNF\alpha$, interleucinas e $NF\kappa B$, entretanto os mecanismos pelos quais as espécies podem mediar essa sinalização celular ou causar danos teciduais não estão completamente esclarecidos (Guzik, Korbust e Adamek-Guzik, 2003).

1.1.4. PROTEÍNAS RELACIONADAS AO ESTRESSE NITROSATIVO E A FEBRE

Em resposta a um estímulo patológico, o organismo reage com a liberação, ativação ou síntese de diversas substâncias, que são denominados mediadores inflamatórios. Dentre esses fatores podemos enumerar diversas proteínas que são responsáveis pela gênese, manutenção ou controle da resposta inflamatória.

Em trabalho realizado por nosso grupo utilizou-se a estratégia de análise proteômica de hipotálamos de animais desafiados com LPS ou PGE₂, com objetivo de identificar proteínas diferencialmente abundantes que possam ter um papel importante durante a resposta febril. Na febre induzida por LPS foram identificadas 1388 proteínas diferencialmente abundantes, dentre elas proteínas relacionadas às vias inflamatórias, vias do metabolismo energético e também do metabolismo de lipídeos (Firmino *et al.*, 2018). Dentre essas proteínas foram identificadas proteínas relacionadas ao metabolismo do NO, como por exemplo, a nNOS e a citoglobina (Cygb).

A Cygb é uma proteína que pertence à família das globinas, sendo identificada pela primeira vez no ano de 2001 em células hepáticas de ratos, quando foi descrita como um importante regulador da reparação tecidual no fígado (Kawada *et al.*, 2001). É um monômero de 21 kDa, hexacoordenado nos imidazóis de His 113 e His 81, como pode ser observado na Figura 4.

Estudos demonstraram que ela é uma proteína capaz de controlar os níveis de NO teciduais, já que há uma ligação da molécula ao seu grupamento heme nas situações em que há um aumento da concentração de NO (Backer, De *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2012). Essa ligação é controlada pelo estado redox dos seus resíduos Cys₃₈ e Cys₈₃ que parece atuar como um “interruptor molecular”, ativando a proteína apenas nas condições necessárias, ou seja, no estresse oxidativo/nitrosativo, o que aponta que essa proteína está relacionada à homeostase do NO (Backer, De *et al.*, 2018).

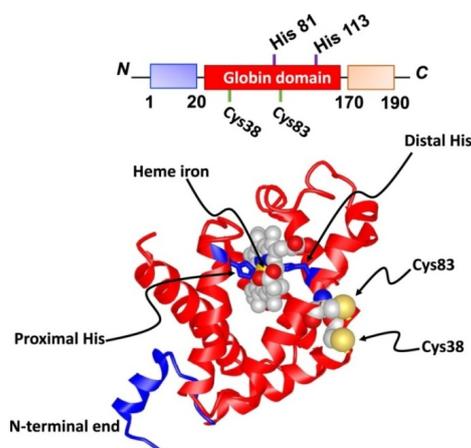


Figura 4: Representação esquemática dos domínios e estrutura terciária da citoglobina. Fonte: (Mathai *et al.*, 2020).

Devido à sua ação como sequestradora de NO, estudos têm sugerido um papel protetor da Cygb em diferentes processos patológicos (Ou *et al.*, 2018; Yassin *et al.*, 2018). Até o momento foi demonstrado efeito na supressão tumoral (Hoang *et al.*, 2022; Rowland *et al.*, 2019; Thuy *et al.*, 2015), reparo tecidual (Wei *et al.*, 2019), cirrose hepática (Ali *et al.*, 2018), arteriosclerose (Ou *et al.*, 2018) e controle da pressão arterial (Liu *et al.*, 2017).

Além da investigação do papel de proteínas específicas, o estudo de modificações pós-traducionais (PTM) pode revelar alvos moleculares relevantes e/ou essenciais para este processo e que poderão ser úteis para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos, bem como para o desenvolvimento de terapias farmacológicas mais específicas, que sejam capazes de controlar a resposta febril com maior eficácia e menor incidência de efeitos indesejáveis (Lennicke *et al.*, 2016).

Os resíduos de cisteína têm um papel importante na função, atividade enzimática e interação proteína-proteína, sendo um importante alvo para a análise de PTM. Uma das modificações que esses resíduos podem sofrer é a S-nitrosilação (SNO), que tem sido mostrada como uma espécie de “interruptor” do estado redox em vários eventos fisiológicos ou patológicos, como por exemplo, isquemia-reperfusão, cardioproteção, neurogênese e transmissão sináptica. A SNO é outra forma do NO realizar sinalização celular, além da via clássica de ativação do cGMP. A formação da S-nitrocisteína acontece pela adição do grupamento nitroso a cisteína reduzida (Mnatsakanyan *et al.*, 2019).

A manutenção dos níveis de proteínas S-nitrosiladas se deve principalmente ao equilíbrio entre a nitrosilação e a denitrosilação, realizada por meio de controle enzimático. As SNO podem ser formadas por diversas rotas químicas quando há a oxidação de um elétron, como por exemplo, a transferência do grupamento NO de complexos metal-NO para a cisteína (Stomberski, Hess e Stamler, 2019). Estudos apontam que a reação de transnitrosilação é um importante mecanismo fisiológico para a formação de proteínas nitrosiladas. Essa reação consiste na transferência do grupamento NO entre cisteínas, onde proteínas-SNO que transferem seu grupamento NO são denominadas nitrosilases (Stamler e Hess, 2010). Nos organismos podemos encontrar tanto proteínas quanto tios de baixo peso molecular nitrosilados, entre eles a coenzima A (CoA), formando a S-nitroso-coenzima A (SNO-

CoA) e a glutationa (GSH), gerando assim a nitrosoglutationa (GSNO), uma importante molécula endógena doadora de NO. A maquinaria que controla a desnitrosilação inclui o sistema Trx (tioredoxina), que são desnitrosilases de alto peso molecular, e os sistemas GSNO redutase (GSNOR) e SNO-CoA redutase (SNO-CoAR) (Figura 5) (Stomberski, Hess e Stamler, 2019).

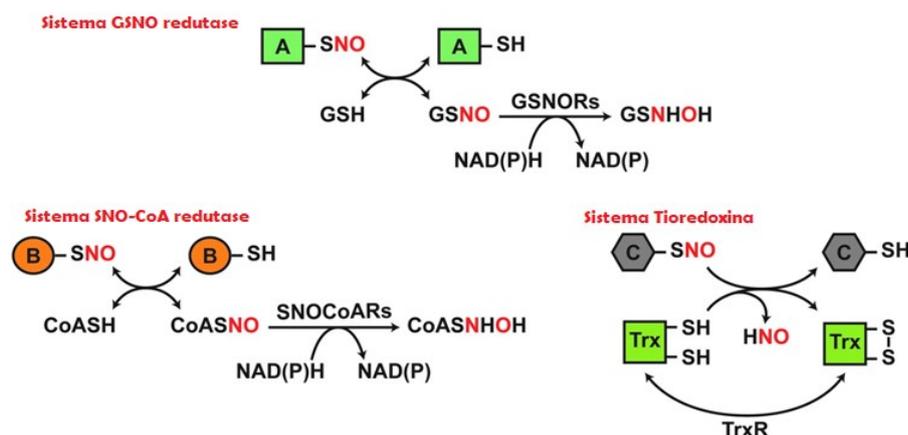


Figura 5: Sistemas de controle enzimático da S-nitrosilação. As desnitrosilases GSNOR e SNO-CoAR regulam a destrinsilação através de GSNO e SNO-CoA, respectivamente, enquanto as Trx realizam a desnitrosilação diretamente. Adaptado de: (Stomberski, Hess e Stamler, 2019).

Evidências indicam que a GSNOR pode ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento de doenças, tais como acidente vascular encefálico (Khan *et al.*, 2020), encefalomielite autoimune (Saxena *et al.*, 2018) e asma (Que *et al.*, 2002).

Considerando o exposto, a análise de proteínas relacionadas ao estresse nitrosativo, bem como o entendimento dos mecanismos relacionados ao NO podem esclarecer o papel desse importante mediador na resposta febril.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar o papel do óxido nítrico e proteínas envolvidas na regulação do óxido nítrico durante a febre e a antipirese promovida pela dipirona e paracetamol.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Quantificar NO no hipotálamo, TAM e fígado de animais febris e tratados com antipiréticos.
- b. Analisar o papel do NO produzido no hipotálamo sobre os mecanismos de gênese e manutenção da febre;
- c. Investigar se o tratamento com dipirona ou paracetamol interfere na produção tecidual de NO e se seus mecanismos de ação estão relacionados com as vias de produção de NO;
- d. Investigar o papel da nitrosilação/desnitrosilação durante a febre induzida por LPS;
- e. Validar o aumento da expressão hipotalâmica de citoglobina, uma sequestradora de NO após dose pirogênica de LPS;
- f. Investigar a função de Cygb examinando os níveis de citocinas inflamatórias e ativação de fatores de transcrição.

CAPÍTULO II

Influência do óxido nítrico na febre e na antipirese promovida por dipirona e paracetamol

2.1. INTRODUÇÃO

Durante o processo inflamatório, um dos processos que integra o complexo arranjo de respostas mediadas pelo encéfalo é o aumento controlado da temperatura corporal, denominado febre (Evans, Repasky e Fisher, 2015; Roth e Blatteis, 2014). A febre é uma reação fisiológica desencadeada por pirógenos endógenos, como citocinas e eicosanoides, ou exógenos, como o lipopolissacarídeo (LPS) que ativam respostas de geração e manutenção de calor (Morrison e Nakamura, 2019). Experimentalmente, um dos principais modelos para a indução da resposta febril é a injeção do LPS, o que induz a produção e liberação de citocinas na circulação, as quais induzem síntese de COX-2 em células endotélias encefálicas e, conseqüentemente, a produção de PGE₂, que promove a ativação do hipotálamo, que é considerado o centro coordenador da termorregulação (Yamashiro, Souza, e Melo Soares, 2019).

Em algumas situações, o aumento pronunciado da temperatura pode levar a danos metabólicos e celulares, sendo então necessário seu tratamento (Walter *et al.*, 2016). A terapia antipirética tem como objetivo impedir e/ou controlar o aumento da temperatura e prevenir seus efeitos deletérios (Hasday, Fairchild e Shanholtz, 2000).

A maioria dos medicamentos antipiréticos, como o ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e o celecoxibe, pertence à classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que tem como mecanismo de ação a inibição das COX 1 e/ou 2 e conseqüentemente do seu produto, que é a PGE₂, considerada o mediador final da febre (Botting, 2006; Zamprônio, Soares e Souza, 2015). Entretanto, além da resposta dependente da COX, estudos sugerem que existem mecanismos alternativos para a geração da febre (Fabricio *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2011), hipótese suportada também pela evidência que medicamentos com mecanismo de ação independente da inibição da síntese de PGE₂, como a dipirona e o paracetamol, apresentam potente ação antipirética (Engström Ruud *et al.*, 2013; Malvar *et al.*, 2011). É importante ressaltar que, apesar de serem os medicamentos mais frequentemente utilizados como analgésicos e antipiréticos, o mecanismo de ação desses fármacos continua incerto (Cazacu, Mogosan e Loghin, 2015).

O óxido nítrico (NO) é um gás que nos mamíferos tem um papel chave na regulação da pressão arterial, neurotransmissão e nos mecanismos de defesa celular (Minhas, Bansal e Bansal, 2020; Valko *et al.*, 2007). O NO é sintetizado através na transformação da L-arginina em NO e L-citrulina, reação catalisada por flavoproteínas dependentes de NADPH, chamadas óxido nítrico sintase (NOS) (Epstein, Moncada e Higgs, 1993).

Diversos estudos demonstram que o NO é uma molécula de sinalização importante nas vias relacionadas à inflamação (Farah, Michel e Balligand, 2018; Guzik, Korbut e Adamek-Guzik, 2003). Ainda é controverso o papel do NO na febre. Já foi demonstrado que há um aumento na produção de NO quando células são submetidas ao aumento de temperatura (Pritchard, Li e Repasky, 2005) e que a injeção de inibidores de NOS provoca uma queda na temperatura em ratos (Dantonio *et al.*, 2016). Por outro lado, demonstrou-se também que a injeção central de inibidores da síntese de NO pode causar aumento da temperatura e que há uma menor concentração de NO na área pré-óptica hipotalâmica durante a febre (Simon, 1998; Steiner *et al.*, 2002).

O NO pode exercer suas ações de sinalização através de modificação pós traducional do tipo S-nitrosilação (SNO), que modula respostas fisiológicas e patológicas, tais como liberação de insulina, regulação inflamatória (Reynaert *et al.*, 2004) e sinalização cardiovascular (Lima *et al.*, 2010). A SNO consiste em uma reação reversível entre o NO e grupamentos sulfidríla de resíduos de cisteína. A concentração de proteínas S-nitrosiladas é controlada enzimaticamente, sendo a nitrosilação promovida por nitrosilases e a denitrosilação catalisada por denitrosilases, incluindo a S-glutaniona redutase (GSNOR) (Stamler, Lamas e Fang, 2001).

Com base no exposto, o objetivo desse estudo é, primeiramente, confirmar que durante a febre induzida pelo LPS os níveis de NO estão aumentados em tecidos relacionados com a gênese e manutenção da febre – fígado, TAM e hipotálamo - e a possível relação entre NO e o mecanismo de ação de medicamentos antipiréticos, além de verificar se o excesso de NO circulante durante a febre pode promover a nitrosilação de proteínas, avaliando o papel da desnitrosilação nesse contexto.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados ratos (*Rattus Norvegicus*) da variedade *Wistar*, pesando entre 200-250 g. Os animais eram provenientes do Biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB) e foram mantidos em ambiente com temperatura ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) e luminosidade (das 7:00 às 19:00) controladas, com água e alimentos fornecidos *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Biologia da UnB, Protocolo 100/2017 (Anexo) e estão de acordo com o Guia Nacional de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

Em todos os experimentos, os animais receberam implante intra-abdominal de transmissores de temperatura (*SubCue Data Loggers, Calgary, Canadá*) sete dias antes dos experimentos farmacológicos. O procedimento de implante ocorreu por meio de laparotomia, onde o transmissor desinfetado foi inserido na cavidade peritoneal em animais anestesiados com uma mistura de cetamina (Cloridrato de Cetamina 10 %, Ketamina Agener®, Agener União, São Paulo, Brasil) e xilazina 2 % (Calmiun®, Agener União, São Paulo, Brasil), nas doses de 60 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal (i.p.). Foi feita a sutura no músculo e na pele da incisão e então os animais receberam tratamento profilático com antibiótico (Cloridrato de Oxitetraciclina, Terramicina®, Pfizer, São Paulo, Brasil) na dose de 10 mg/kg e antiinflamatório (Flunexina, Benamine®, MSD, São Paulo, Brasil), na dose de 2,5 mg/kg.

2.2.2. MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DOS RATOS

A temperatura corporal dos ratos durante os ensaios foi medida através dos transmissores implantados na cavidade peritoneal. Os animais permaneceram na sala de experimentação, com temperatura controlada, por pelo menos 12 h antes do início dos experimentos. A temperatura corporal foi mensurada em intervalos de 15 min, iniciados 2 h antes de qualquer injeção até o final do experimento. A temperatura basal de cada animal foi determinada pelas quatro medições anteriores

a qualquer tratamento. O procedimento experimental foi realizado dentro da zona termoneutra para ratos, ou seja, temperatura ambiente controlada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (Gordon, 1990).

2.2.3. EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS

2.2.3.1. Indução de febre e tratamento com antipiréticos

Para investigar os efeitos da febre na produção de NO periférico, grupos de ratos receberam injeção intravenosa (i.v.) de LPS na dose de $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (endotoxina de *E.coli* 0111:B4, Sigma Aldrich) ou seu veículo (solução salina estéril, 2 mL/kg). Os animais tiveram sua temperatura corporal aferida em intervalos de 15 min por 2,5 h ou 5 h. Após esse tempo, os animais foram anestesiados com a mesma mistura de xilazina e cetamina usados no procedimento cirúrgico, foi realizada punção cardíaca para a coleta de sangue e então os animais foram eutanasiados. Em um segundo conjunto de experimentos, 30 min antes da administração de LPS os animais receberam tratamento por via oral (v.o.) de ibuprofeno (20 mg/kg), celecoxibe (10 mg/kg), paracetamol (180 mg/kg), dipirona (120 mg/kg) ou seu veículo. Devido ao efeito do paracetamol cessar após 2,5 h (Gomes, 2017), os animais desse grupo receberam nova dose do fármaco 2 h após a injeção de LPS. As doses foram selecionadas de acordo com dados da literatura e padronizadas em nosso laboratório (Gomes *et al.*, 2018).

Os animais tratados com os diferentes fármacos foram monitorados por 5 h e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca após esse período. Após a eutanásia, foram dissecados o hipotálamo, fígado e tecido adiposo marrom (TAM), que foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para análises posteriores.

2.2.3.2. Obtenção de amostra para espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Com o objetivo de quantificar o NO produzido no hipotálamo, TAM e fígado de ratos, foi realizada a técnica de *spin trapping* utilizando o complexo ferro-

dietilditiocarbamato (Fe-DETC), seguindo o protocolo descrito por Üçal e colaboradores (2017).

Os diferentes grupos de animais foram tratados conforme os experimentos descritos no item 2.2.1. Entretanto, neste experimento, 4 h após a injeção de LPS ou solução salina estéril, foi injetado DETC (500 mg/kg) (Sigma-Aldrich) diluído em água ultrapura, via subcutânea, no pescoço. Cinco minutos depois, foi injetado por via subcutânea na região da coxa o complexo Fe-citrato (40 mg/kg e 160 mg/kg, respectivamente) (Sigma-Aldrich), também diluído em água ultrapura. Após 1 h deste tratamento, os animais foram eutanasiados e foram dissecados o hipotálamo, o fígado e o TAM proveniente da região interescapular, que foram colocados em uma seringa entre dois blocos de gelo, completando o volume final de 400 µL, e mantidos congelados a -80° C até as análises por EPR.

2.2.3.3. Tratamento com doadores de NO

Para avaliar como o efeito dos fármacos se comportava na presença de doadores de NO, foram realizados dois *sets* de experimentos com a L-arginina, precursora da síntese de óxido nítrico na presença de NOS. Primeiramente, foram testadas duas doses para avaliar o efeito do tratamento com L-arginina na temperatura dos animais e na biodisponibilidade de NO. Para isso, L-arginina nas doses de 100 e 300 mg/kg foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes da indução de febre com LPS, conforme descrito anteriormente.

No segundo set de experimento, foi feito o co-tratamento de L-arginina + dipirona (i.p. e vo, respectivamente), L-arginina + paracetamol (i.p. e vo, respectivamente), ou seus respectivos veículos 30 min antes da injeção intravenosa de LPS. A dose de L-arginina escolhida para esse experimento foi a dose de 100 mg/kg, já que essa dose não interferiu na temperatura corporal dos animais.

Em ambos os experimentos, após 5 h do estímulo febril, os animais foram anestesiados e então foi realizada punção cardíaca para coleta de 1 ml de sangue usado para medida de hemoglobina nitrosilada (HbNO).

2.2.3.4. Tratamento com inibidor de GSNOR

Com o objetivo de avaliar o papel da S-nitrosilação na febre, o inibidor da GSNOR N6022 (Cayman Chemical Company, EUA) foi administrado por via intraperitoneal nas doses de 1 e 3 mg/kg, diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,8%. A injeção foi realizada 30 min antes do desafio com LPS e o experimento seguiu conforme os anteriores.

2.2.4. PREPARO DE AMOSTRAS PARA MEDIDAS DE HbNO

Para análise de HbNO, 1 mL de sangue foi colocado em seringa heparinizada. As seringas foram centrifugadas a 2000 g por 5 min e então, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C.

2.2.5. MEDIDAS DE EPR

Os blocos de gelo contendo as amostras foram retirados das seringas ainda congelados e transferidos imediatamente para um *Finger Dewer* contendo nitrogênio líquido. Todos os espectros de EPR foram gravados à temperatura de nitrogênio líquido (77 K), usando um espectrômetro Bruker EMX500. As configurações do equipamento foram: frequência em banda X (9,35 GHz), potência 2 mW e frequência de modulação de 100 G, 5 G de amplitude de modulação, constante de tempo de 10 ms e 5 varreduras adicionados em conjunto para cada medição.

Para a quantificação de NO tecidual, a concentração foi determinada a partir da curva de calibração para a intensidade do sinal EPR de tecido adiposo tratados com concentrações conhecidas de MaHNonate, um doador de NO. Para isso, foi dissecado TAM de ratos, lavado em tampão Krebs Hepes (KHB) gelado e então incubados por 10 min com 10 μ M de L-NAME para a remoção de todo o NO presente no tecido. Após isso, foi adicionada MaHNonate nas concentrações de 5, 10 e 20 μ M e então a solução borbulhada de FeSO₄ e DETC. Após incubação por exatamente 1 h, os tecidos foram colocados em seringa, entre blocos de gelo, da mesma forma que a citada anteriormente para as amostras. Já para a quantificação de HbNO, foi realizada uma curva de calibração da intensidade do sinal de EPR de eritrócitos tratados com concentrações conhecidas de Na₂S₂O₄ (1, 10 e 100 μ M).

2.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm EPM. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) para realizar as análises estatísticas descritas nas legendas de cada figura. As diferenças de temperatura corporal foram avaliadas por análise estatística da área sob a curva (ASC), seguindo modelo de Saramago e colaboradores (2019). Foi escolhido o valor de 36 °C como basal a ASC foi calculada de 1 a 5h. Os valores de ASC, que corresponde ao Índice térmico foram expressos em °C x horas. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. CONCENTRAÇÃO DE NO DURANTE A FEBRE INDUZIDA POR LPS E NA ANTIPIRESE

Primeiramente, para avaliar a produção periférica de NO, foi realizado em trabalho anterior a quantificação de HbNO. A HbNO é formada quando há um aumento da disponibilidade de NO no sangue, sendo a reação da hemoglobina com o NO um mecanismo de proteção do organismo durante o estresse nitrosativo (Dikalov e Fink, 2005). Resumidamente, nossos resultados demonstraram um considerável aumento de HbNO nos ratos 5 horas após a administração do LPS. Esse tempo corresponde ao segundo pico da febre induzida por LPS (Figura 6B). Não foi encontrada alteração significativa de HbNO no grupo eutanasiado 2,5 h após o estímulo pirogênico, tempo correspondente ao primeiro pico característico na febre induzida por LPS (Figura 6A) e por isso apenas o tempo de 5 h foi selecionado para análises posteriores. Neste conjunto de experimentos também foi testado o efeito do tratamento com fármacos antipiréticos de diferentes classes. Após o tratamento com os AINEs ibuprofeno ou celecoxibe, não foi observada diferença quando comparado ao grupo LPS, o que demonstra que esses fármacos não estão relacionados ao metabolismo do NO (Figura 6C e 6D). No entanto, nos animais que receberam tratamento com dipirona ou paracetamol, observamos redução nos níveis

de HbNO em relação ao grupo LPS, com indicação de que essas substâncias podem estar relacionado aos níveis de NO circulantes (Figura 6E e 6F) (Gomes, 2017).

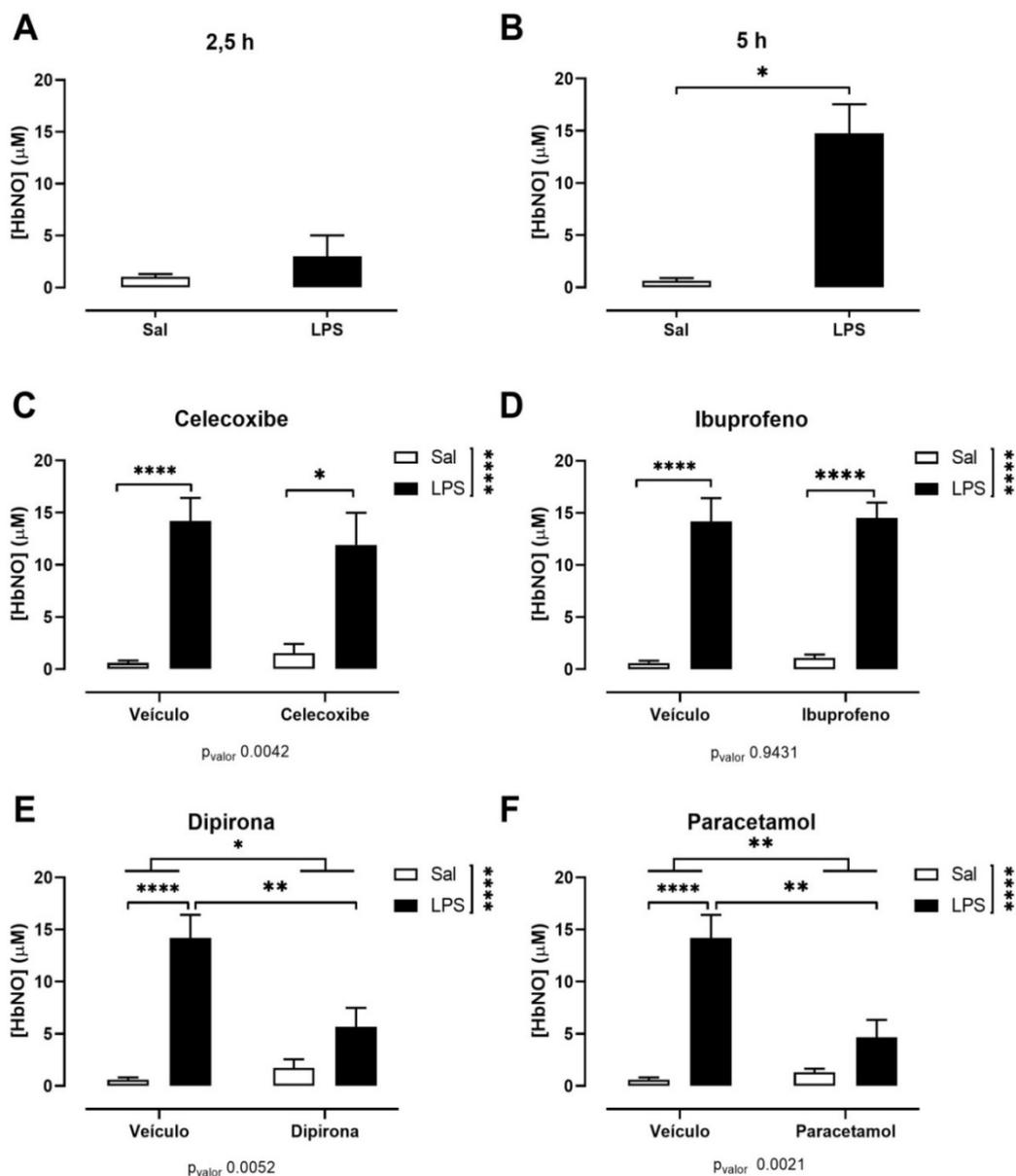


Figura 6: Concentração de HbNO no sangue de ratos febris e após tratamento com diferentes drogas antipiréticas. Os animais que receberam LPS (5 µg/kg, i.v.) ou soro fisiológico (2 ml/kg) foram eutanasiados 2,5 ou 5 h após o estímulo, e apenas foi observado um aumento nos níveis de HbNO após 5 horas (painéis A e B) (n = 4, teste t). Nos animais que receberam pré-tratamento com ibuprofeno ou celecoxibe (painéis C e D), não foi encontrada diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo Veículo/LPS (n = 5). Nos animais tratados com dipirona ou paracetamol foi observada uma redução nos níveis de HbNO quando comparados ao grupo Veículo/LPS (painéis E e F) (n = 5). As colunas representam a média ± SEM. **** p < 0,0001; ** p < 0,01; * p < 0,05 quando comparado ao grupo correspondente indicado; ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. (Adaptado de GOMES, 2017).

Foi observado o aumento significativo do complexo Fe-DETC-NO no TAM e fígado dos animais. Corroborando os dados de HbNO que reflete os níveis de NO periférico, nos animais tratados com paracetamol houve uma redução dos níveis de NO no hipotálamo, TAM e fígado, apontando que esse fármaco é capaz de inibir a elevação dos níveis de óxido nítrico durante antipirese promovida por ele também em tecidos relacionados com a gênese da febre. Já nos animais tratados com dipirona uma redução significativa foi encontrada no TAM e no fígado dos animais (Figura 8).

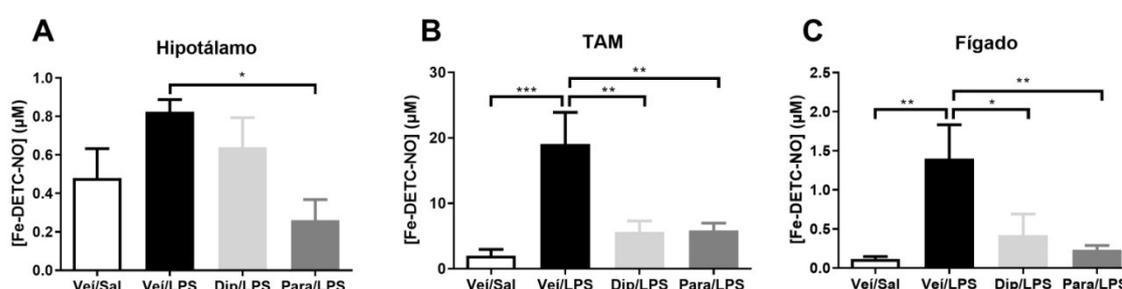


Figura 8: Concentração do complexo Fe-DETC-NO em diferentes tecidos de animais tratados com dipirona ou paracetamol. As colunas representam a concentração do complexo Fe-DETC-NO em μM no (A) hipotálamo, (B) tecido adiposo marrom ou (C) fígado de animais tratados com paracetamol ou dipirona 30 min antes da administração i.v. de LPS ou solução salina ($n = 4-5$). Os tecidos foram coletados 5h após da administração de LPS. Os dados representam a média \pm SEM. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo correspondente indicado; ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Bonferroni.

2.3.2. EFEITO DO COMPLEXO FE-DETC NA TEMPERATURA CORPORAL DE RATOS

Devido ao aumento dos níveis de NO observado nos ratos após a administração do estímulo pirogênico, foi investigado se o sequestro de NO pode modificar o perfil da febre induzida pelo LPS. O complexo Fe-DETC é formado *in vivo* quando Fe-citrato encontra o DETC na presença de NO. Essa ligação inativa o NO, por isso, esse complexo é denominado como um sequestrador de NO (Dikalov e Fink, 2005). Nos animais que receberam a injeção de Fe-citrato e DETC 1 h antes do segundo pico da febre, foi observada uma redução da temperatura nos grupos Veil/LPS (Figura 9B e 10B), já que em 5 h, momento da eutanásia dos animais, é observada uma diferença significativa no ΔT entre os grupos que receberam o complexo Fe-DETC em comparação ao grupo que não recebeu (Figuras 9D e 10D).

Isso indica que o NO pode estar relacionado com a manutenção da temperatura corporal no processo febril. Podemos observar também que o tratamento com Fe-Citrato e DETC não alterou o efeito da dipirona ou do paracetamol (Figura 9B e C e 10B e C, respectivamente).

A elevação de temperatura observada na primeira hora e na quarta hora, que ocorreu em todos os grupos experimentais é devido ao estresse ocasionado pela manipulação dos animais para a administração dos tratamentos, e se repete em todos os experimentos realizados.

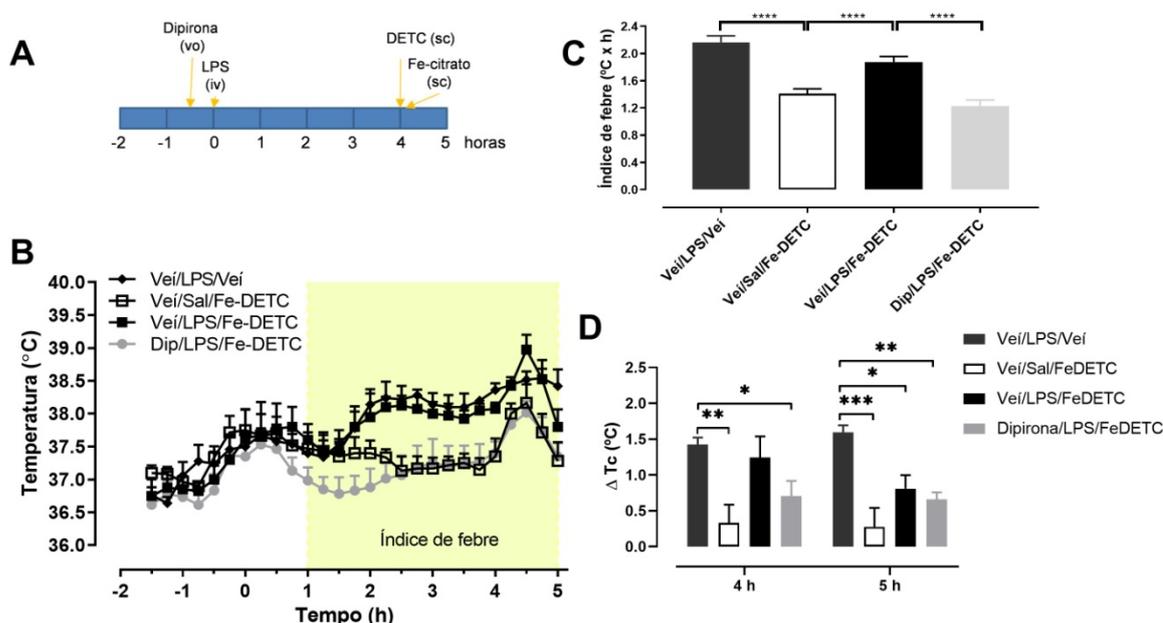


Figura 9: Evolução temporal da temperatura corporal de ratos após tratamento com dipirona e injeção de LPS e Fe-DETC. (A) Representação esquemática dos tempos em que cada tratamento foi realizado, as setas indicam o tempo do respectivo tratamento na linha do tempo em horas. (B) Resposta induzida pelo pré-tratamento com dipirona (120 mg/kg, v.o.) ou veículo, seguido de injeção de LPS (5 µg/kg, i.v.) ou solução salina na temperatura dos ratos. Foi realizada também a administração da solução de DETC (500 mg/kg) e de solução Fe-Citrato (40 mg/kg e 160 mg/kg, respectivamente), conforme esquema do painel A. O índice térmico relativo ao momento de febre é esclarecido pelos dados mostrados pelas barras horizontais no painel (C). O painel D ilustra a diferença da temperatura corporal dos animais em relação a sua temperatura basal antes da administração de DETC (4 h) e no momento da eutanásia dos animais (5h). Valores são médias ± EPM. (n=4-6). **** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05 quando comparado ao grupo correspondente indicado; ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Bonferroni.

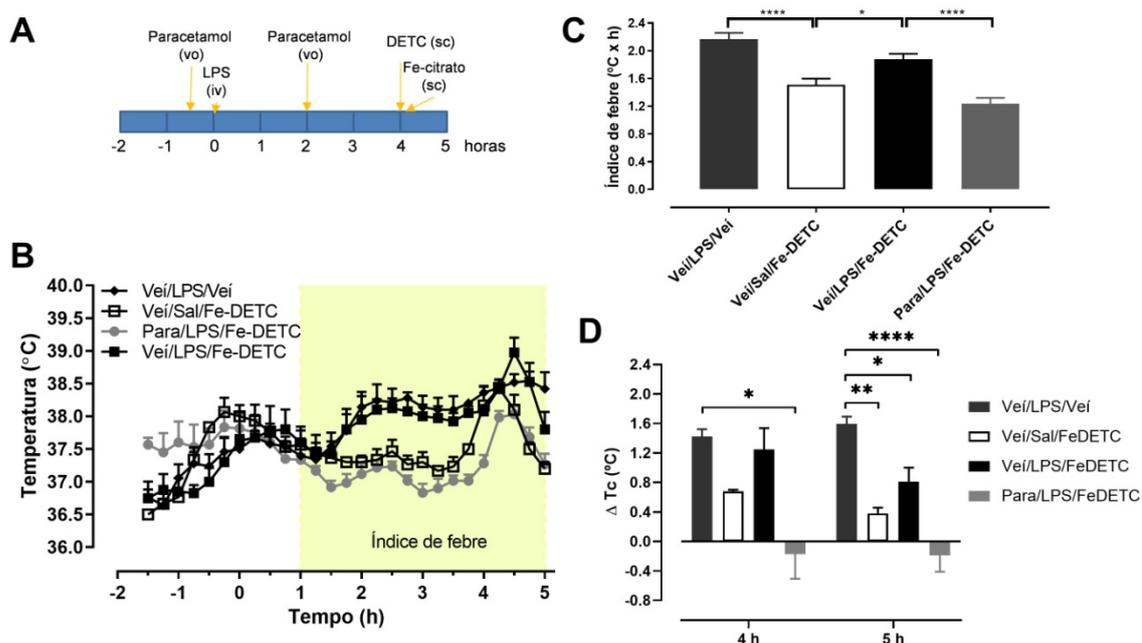


Figura 10: Evolução temporal da temperatura corporal de ratos após tratamento com paracetamol e injeção de LPS e FeDETC. (A) Representação esquemática dos tempos em que cada tratamento foi realizado, as setas indicam o tempo do respectivo tratamento na linha do tempo em horas. (B) Resposta induzida pelo pré-tratamento com paracetamol (180 mg/kg, v.o.) ou veículo, seguido de injeção de LPS (5 μ g/kg, i.v.) ou solução salina na temperatura dos ratos. Foi realizada também a administração da solução de DETC (500 mg/kg) e de solução Fe-Citrato (40 mg/kg e 160 mg/kg, respectivamente), conforme esquema do painel A. O índice térmico relativo ao momento de febre é esclarecido pelos dados mostrados pelas barras horizontais no painel (C). O painel D ilustra a diferença da temperatura corporal dos animais em relação a sua temperatura basal antes da administração de DETC (4 h) e no momento da eutanásia dos animais (5h). Valores são médias \pm EPM. (n=4-6). **** p < 0,0001; ** p < 0,01; * p < 0,05 quando comparado ao grupo correspondente indicado; ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Bonferroni.

2.3.3. EFEITO DA L-ARGININA, PRECURSOR DE NO SOBRE A FEBRE E A ANTIPIRESE

Com o objetivo de investigar se o efeito da dipirona e do paracetamol tem relação com os níveis de NO aumentados na febre, os animais receberam a administração de L-arginina, precursor do NO, com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade do óxido nítrico. Para isso, primeiramente foram testadas duas doses para avaliar o efeito da L-arginina na febre. A dose de 100 mg não alterou a temperatura dos animais, já a dose de 300 mg provocou uma redução da resposta febril, além da redução dos níveis de HbNO (figura 11). Como o objetivo do experimento era verificar se o aumento de NO poderia reverter o efeito dos fármacos, a dose de 100 mg foi selecionada para o experimento seguinte.

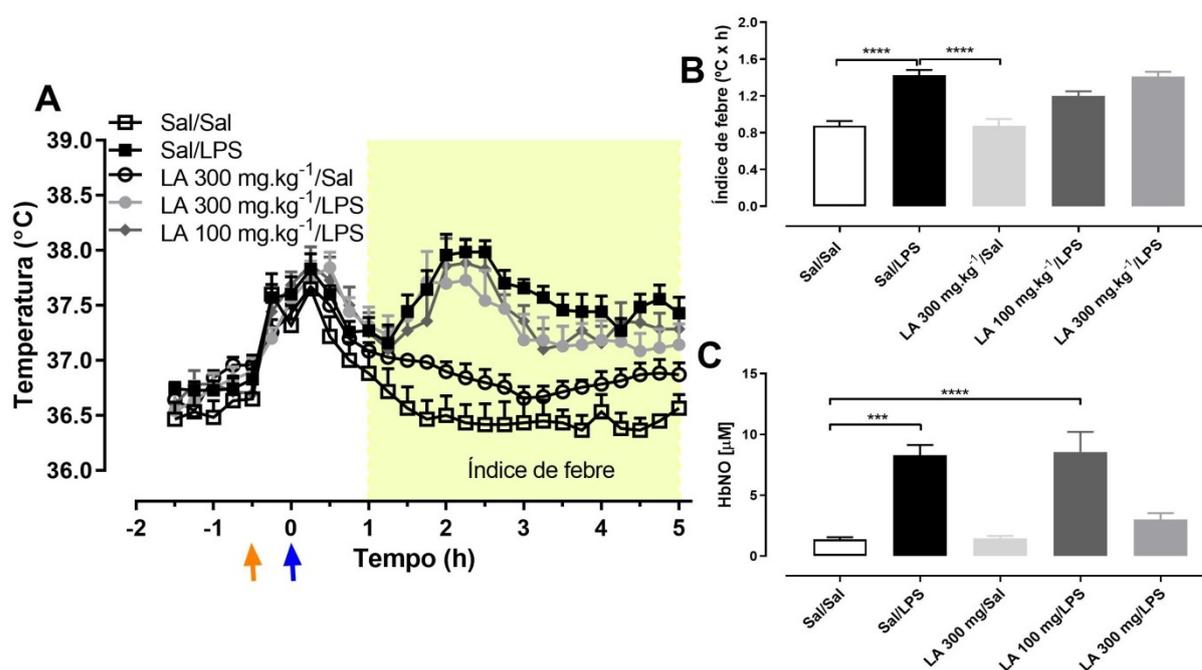


Figura 11: Efeito da administração de L-arginina (LA) na temperatura corporal de ratos e na concentração de HbNO. (A) Resposta induzida pelo pré-tratamento com L-arginina (100 ou 300 mg/kg, i.p.) ou veículo – indicado pela seta laranja, seguido de injeção de LPS (5 µg/kg, i.v.) ou solução salina – indicada pela seta azul, na temperatura dos ratos. (B) O índice térmico relativo ao momento de febre é esclarecido pelos dados mostrados pelas barras horizontais. (C) Concentração de HbNO no sangue de ratos. Valores são médias ± EPM. (n=5-6). **** p < 0,0001; *** p < 0,001; * p < 0,05 quando comparado ao grupo correspondente indicado, ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Bonferroni.

Nos animais que receberam L-arginina como co-tratamento com dipirona ou paracetamol, o efeito antipirético dos fármacos não foi alterado. Nesses animais, se nota ainda, que mesmo na presença de um doador de NO, os níveis de HbNO estão diminuídos (Figura 12).

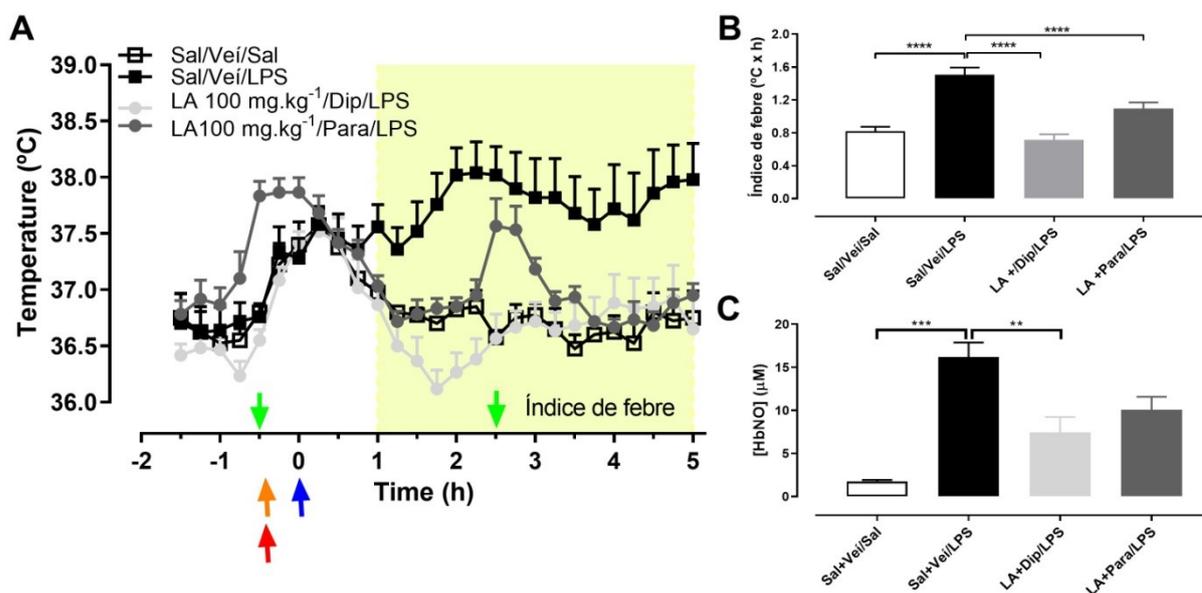


Figura 12: Efeito da administração de L-arginina (LA) na temperatura corporal e na concentração de HbNO de ratos tratados com antipiréticos. (A) Resposta induzida pelo pré-tratamento com L-arginina (100 mg/kg, i.p.) ou veículo, juntamente com a administração por via oral de paracetamol ou dipirona, seguido de injeção de LPS (5 µg/kg, i.v.) ou solução salina na temperatura dos ratos. As setas laranja, vermelha, verde e azul indicam o momento da administração dos tratamentos LA, dipirona, paracetamol e LPS, respectivamente. (B) O índice térmico relativo ao momento de febre é esclarecido pelos dados mostrados pelas barras horizontais. (C) Concentração de HbNO no sangue de ratos. Valores são médias ± EPM. (n=4-6). **** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01 quando comparado ao grupo correspondente indicado, ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Bonferroni.

2.2.1. EFEITO DO INIBIDOR DA GSNOR SOBRE A FEBRE

Com o objetivo de investigar qual o papel desempenhado pela inibição da GSNOR no mecanismo da reposta febril e se o mesmo era capaz de causar alguma alteração na temperatura, os animais foram tratados por via intraperitoneal com N6022 nas doses de 1 ou 3 mg/kg, ou seu veículo. As doses utilizadas do inibidor da GSNOR foram selecionadas de acordo com dados da literatura (Blonder *et al.*, 2014).

Nos animais que receberam a dose de 1 mg/kg houve um aumento da temperatura até 2,5 h, quando comparado aos demais grupos, confirmado pelo aumento significativo na ASC quando comparado ao grupo Veí/LPS (figura 13).

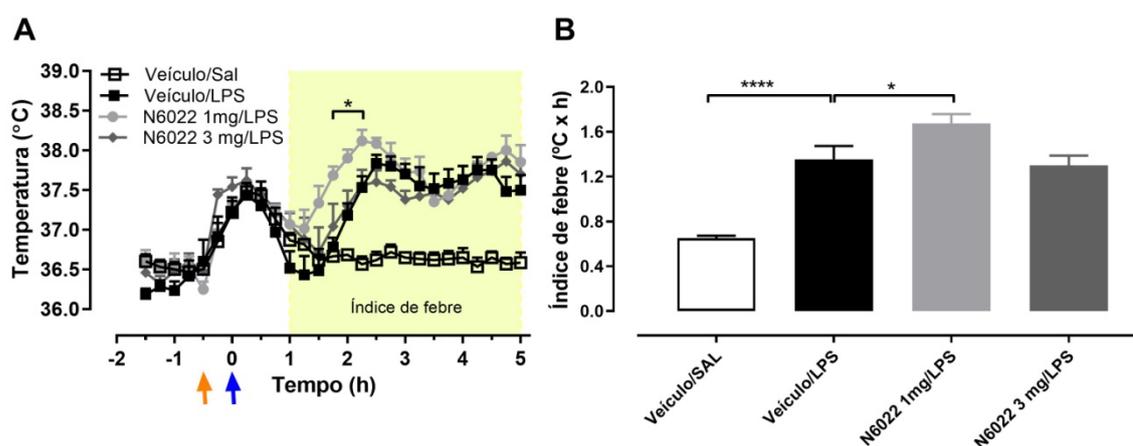


Figura 13: Efeito da administração de N6022 na temperatura corporal de ratos febris. (A) Resposta induzida pelo pré-tratamento com N6022 (1 ou 3 mg/kg, i.p.) ou veículo, seguido de injeção de LPS (5 µg/kg, i.v.) ou solução salina na temperatura dos ratos. As setas laranja e azul representam o momento da administração de N6022 ou LPS, respectivamente. (B) O índice térmico relativo ao momento de febre é esclarecido pelos dados mostrados pelas barras horizontais. Valores são médias ± EPM. (n=5-6). * P <0,05, ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Bonferroni.

2.3. DISCUSSÃO

O óxido nítrico é um radical abundante no organismo e atua como uma importante molécula de sinalização em diferentes processos biológicos, incluindo a termorregulação (Valko *et al.*, 2007). Ainda é controverso o papel do NO na febre, já que estudos apontam que ele possa atuar como pirógeno (Pritchard, Li e Repasky, 2005; Roth *et al.*, 1998) ou em alguns casos como antipirético (Simon, 1998; Steiner *et al.*, 2002).

Nossos resultados apontaram que 5 h após a injeção de LPS há uma formação quinze vezes maior de HbNO do que nos animais controle. Não houve diferença significativa em 2,5 h, tempo correspondente ao primeiro pico da febre. A HbNO é formada pela ligação do NO ao heme ferroso penta-coordenado na cadeia α da desoxi-hemoglobina, sendo um mecanismo de proteção contra o estresse nitrosativo, já que inativa o NO reativo quando há excesso dessa molécula circulante (Farah, Michel e Balligand, 2018). A HbNO possui um sinal característico de EPR, que tem a amplitude diretamente proporcional a concentração do complexo na amostra. A estabilidade do complexo HbNO depende de diversos fatores, tais como pH, temperatura e o estado redox do organismo, sendo que o aumento na

concentração pode se dar devido ao acúmulo do complexo ao longo do tempo (Dei Zotti *et al.*, 2020; Dei Zotti, Lobysheva e Balligand, 2018; Jiang *et al.*, 1997). Em nosso modelo, a quantidade de HbNO pode ter sido indetectável no tempo de 2,5 h e o acúmulo do complexo levou a detecção apenas do tempo de 5h. Esses dados apontam que o NO pode ter envolvimento com a manutenção da febre, mas não exclui o fato dessa sinalização ser importante também na gênese da febre.

Como a função dos *spin traps* é capturar o NO livre e formar um complexo estável, eles diminuem a disponibilidade de NO bioativo no organismo (Kleschyov *et al.*, 2000; Vanin, Huisman e Faassen, Van, 2002). Dessa forma, a inibição da febre nos animais do grupo LPS após a administração dos *spin traps* pode ter relação direta com a redução a biodisponibilidade do NO, sugerindo que o NO exerça efeito pirogênico na febre induzida por LPS.

Estes resultados confirmam dados obtidos por outros autores referentes à ação pirogênica do NO. Roth e colaboradores (1998) demonstraram que a injeção central de L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS, provoca queda na temperatura de cobaias, além de atenuar a febre induzida por LPS. Perotti e colaboradores (1999) mostraram que animais tratados com 7-NI, um inibidor seletivo da nNOS, apresentaram redução da febre induzida por LPS. Além disso, já foi demonstrado que macrófagos peritonais produzem mais NO quando há um aumento da temperatura favorecendo a disponibilidade desse gás na periferia (Pritchard, Li e Repasky, 2005). Feleder, Perlik e Blatteis (2007) relataram que o NO estimula a produção de PGE₂ por meio do aumento da atividade das isoformas de COX, sugerindo que o NO possa ter um efeito pirogênico na mediação da resposta febril induzida por LPS.

Entretanto, alguns autores relatam papel antipirético para o NO. Nesse sentido, Gourine (1995) em um estudo que utilizou inibidor da NOS administrado por via i.c.v. em ratos que receberam a aplicação de LPS, mostrou que nessas condições ocorria uma elevação da temperatura corporal e quando fazia-se a injeção de um doador de NO nos animais, o quadro de febre era atenuado. Foi sugerido também uma ação antipirética central, no qual foi apontada uma redução progressiva de NO e cGMP na área pré-óptica, levando os autores desse estudo concluírem que periféricamente o NO parece ter efeito pirogênico e centralmente, um papel antipirético (Steiner *et al.*, 2002).

Nossos dados corroboram a hipótese de que o NO é uma importante molécula pirogênica.

Neste estudo foram analisados os níveis de NO teciduais no hipotálamo, TAM e fígado dos animais. Esses tecidos foram escolhidos para a análise devido sua relação com mecanismos relacionados à resposta febril. É bem documentado que o hipotálamo é o centro coordenador da temperatura corporal, já que integra as informações recebidas pelas vias aferentes de termorreceptores e desencadeia as respostas efetoras necessárias para a manutenção da temperatura corporal adequada (Morrison e Nakamura, 2019). Em nosso modelo, podemos observar uma elevação da concentração do complexo Fe-DETC-NO no hipotálamo dos animais febris quando comparado dos animais que receberam paracetamol e com isso, não desenvolveram febre. Esses dados indicam que o NO possa estar envolvido na sinalização da resposta febril no SNC.

Animais nocaute para células de Kupffer, presentes no fígado, não apresentam resposta febril, além de que, essas células podem produzir PGE₂ após a injeção de LPS, o que demonstra que esse tecido está diretamente relacionado a resposta febril (Ivanov e Romanovsky, 2004; Li *et al.*, 2006). A injeção de LPS promoveu o aumento de Fe-DETC-NO no fígado, que foi prevenido pelo tratamento com os fármacos antipiréticos. Esses dados apontam que o NO possa estar envolvido com a gênese da febre mediada pelas células hepáticas. Soriano e colaboradores (2013) demonstraram que os níveis de NO circulante estão aumentados após estímulo com LPS, sendo reduzidos quando os animais são expostos a sucessivas doses de LPS. Esse aumento de NO é acompanhado pela regulação do sistema heme-oxidase do fígado, indicando um importante papel da regulação de NO por esse órgão após o estímulo com LPS.

Branco e colaboradores (2014), em revisão de literatura, apontaram que o NO periférico pode modular três importantes mecanismos termorregulatórios: nos vasos sanguíneos, músculos esqueléticos e TAM. A injeção intraperitoneal de L-NAME, um inibidor de NO reduz a temperatura do TAM na região interescapular de ratos, sendo que esse efeito poderia acontecer pela inibição do fluxo sanguíneo na região promovido pela noradrenalina (Luca, De, Monda e Sullo, 1995). O TAM é uma importante fonte de produção de calor independente de tremor nos mamíferos, gerando calor principalmente pelo transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna, mediado por proteínas desacopladoras-1 (UCP-1). A atividade

desse tecido é regulada pelo sistema nervoso simpático, e na febre, os neurônios da APOHA induzem a resposta eferente de termogênese mediada pelo TAM (Morrison, 2016; Morrison, Madden e Tupone, 2014). Em nossos resultados observou-se um aumento na concentração do complexo Fe-DETC-NO no TAM dos animais após o estímulo com LPS, o que aponta uma importante participação do NO no processo de termogênese desse tecido.

Nossos dados indicam que os anti-inflamatórios testados que atuam pela via do ácido araquidônico, impedindo a síntese de PGE₂ através da inibição da COX, não parecem interferir na síntese de NO periférico. Em modelo de isquemia e reperfusão em ratos, foi demonstrado que o celecoxibe aumenta a biodisponibilidade de NO e que este fato colaboraria para os efeitos benéficos desse fármaco (Senbel, AbdelMoneim e Omar, 2014). Demonstrou-se também que o efeito analgésico do ibuprofeno, em modelo de dor pós-cirúrgica, está relacionado com a redução dos níveis de NO na medula espinhal (Saad *et al.*, 2016). Entretanto, em nosso modelo experimental, não foram encontradas diferenças na produção de HbNO em animais tratados com celecoxibe ou ibuprofeno.

A dipirona é um sequestrador de NO e peroxinitrito (ONOO⁻) *in vitro* (Costa, Vieira e Fernandes, 2006). No presente estudo, demonstramos que o fármaco reduz a concentração de HbNO e do complexo Fe-DETC-NO no TAM e no fígado dos animais tratados, indicando que é capaz de influenciar o metabolismo do NO. Entretanto, Lorenzetti e Ferreira (1996) demonstraram, em modelo de hiperalgesia mecânica, que o efeito analgésico da dipirona pode ser devido a estimulação da via arginina-NO-cGMP atuando em neurônios periféricos primários e na medula espinhal.

Dentre os fármacos testados, o paracetamol foi o que reduziu os níveis de NO em todos os tecidos testados. Em célula RAW 264.7 estimuladas com LPS, há uma redução dos níveis de nitrato quando são tratadas com paracetamol, de maneira dose dependente (Inaba *et al.*, 2015). Foi demonstrado ainda que os efeitos do paracetamol na hiperalgesia são revertidos pela administração de L-arginina, um doador natural de NO (Björkman *et al.*, 1994), e ainda que a administração de inibidor não seletivo de NOS potencializa o efeito do fármaco em doses subclínicas também no modelo de hiperalgesia em ratos (Bujalska e Gumułka, 1994). Entretanto, no modelo experimental utilizado neste estudo, o co-tratamento com L-arginina não promoveu nenhuma alteração no efeito do fármaco, indicando que a

doação do precursor de NO não tem relação com o mecanismo de ação deste fármaco.

A LA é o substrato das NOS que origina o NO e citrulina, e é classicamente usada em diferentes modelos experimentais a fim de aumentar a biodisponibilidade do NO. A administração de LA nas doses de 100 e 300 mg/kg não teve efeito na temperatura corporal dos animais, indicando que nessas doses, apenas a doação do precursor de NO não é suficiente para aumentar a temperatura corporal. É documentado que o NO, dependendo da dose e da via de administração, pode ter efeitos opostos, o que é chamado de efeito dual do NO (Prado, Schiavon e Cunha, 2002; Tegeder *et al.*, 2002). Na maior dose testada, a LA reduziu a concentração de HbNO, evidenciando o papel dual no NO, que pode estar sendo controlados por mecanismos de feedback (Soriano *et al.*, 2013).

Em nosso estudo, os fármacos testados, apesar de reduzirem a biodisponibilidade de NO, não parecem ter seu mecanismo de ação relacionado a via L-arginina/NO, já que o sequestro de NO promovido por FE-DETC ou a injeção de LA não alterou o efeito antipirético dos fármacos. Trettin e colaboradores (2014) encontraram resultados semelhantes usando altas doses de paracetamol, onde o fármaco não alterou as concentrações de L-arginina. Esse mesmo grupo demonstrou *in vitro* que o fármaco não possui efeito inibitório significativo na atividade de iNOS ou eNOS.

Apesar de nossos dados serem consistentes ao demonstrar que há um aumento nos níveis de NO durante a febre, ainda não é possível correlacionar a redução da biodisponibilidade de NO nos tecidos ao mecanismo de ação da dipirona e do paracetamol, já que a administração de LA não influenciou na resposta antitérmica dos fármacos.

Recentemente, tem sido sugerido que várias ações exercidas pelo NO são decorrentes da nitrosilação de proteínas, uma ligação que é privilegiada quando há excesso de NO no tecido (Liu *et al.*, 2018). Essa modificação pós-traducional modula a atividade de proteínas de maneira dicotômica, podendo ser um agente protetor e regulador, ou tóxico, dependendo da sua concentração e processo no qual ela está envolvida (Anand e Stamler, 2012; Nakamura *et al.*, 2013).

Como nossos dados demonstram o aumento de NO durante a febre, investigamos a relação da S-nitrosilação de proteínas com o aumento da temperatura após a injeção de LPS. Para isso, foi administrado N6022, um inibidor

da GSNOR, que impede o processo de desnitrosilação das proteínas (Sun *et al.*, 2011). Esta droga vem sendo usada em ensaios experimentais em modelos de asma, acidente vascular encefálico e encefalomielite (Khan *et al.*, 2020; Que *et al.*, 2018; Saxena *et al.*, 2018). Liu e colaboradores (2021) demonstraram que a GSNOR pode potencializar a resposta imune inata contra vírus, já que o tratamento com N6022 aumentou a mortalidade dos camundongos infectados com herpes vírus.

Neste estudo, na dose de 1mg/kg, N6022 promoveu um aumento da temperatura em comparação aos animais do grupo veí/LPS. O aumento ocorreu na primeira hora após a administração da droga, e não se estendeu durante todo o período do experimento, provavelmente devido ao curto tempo de meia vida de N6022 (Colagiovanni *et al.*, 2012). Esse fato indica que o aumento de NO durante a febre pode promover a nitrosilação de proteínas e, conseqüentemente desencadear mecanismos para geração e manutenção de calor necessários para o aumento da temperatura que ocorre durante a febre, já que quando a nitrosilação é favorecida em detrimento da desnitrosilação, há um aumento da temperatura corporal dos animais.

2.4. CONCLUSÃO

A formação de NO a partir da L-arginina é uma via bioquímica envolvida na regulação de diversos sistemas. Nossos dados nos permitem sugerir que o NO exerça um importante papel na manutenção da febre, já que se encontra aumentado no sangue, fígado e TAM de animais febris e que a redução da sua biodisponibilidade pelos *spin traps* é capaz de inibir a febre induzida por LPS. O aumento de NO pode estar participando da sinalização através da S-nitrosilação de proteínas, já que quando a desnitrosilação é bloqueada, há um aumento da temperatura corporal dos ratos febris. Apesar do tratamento com dipirona ou paracetamol reduzir a biodisponibilidade do NO, os dados obtidos até o momento não nos permitem afirmar que a ação antipirética desses fármacos esteja relacionada à via L-arginina/NO.

CAPÍTULO III

Cytoglobin attenuates neuroinflammation in lipopolysaccharide-activated primary preoptic area cells via NF- κ B pathway inhibition



Cytoglobin Attenuates Neuroinflammation in Lipopolysaccharide-Activated Primary Preoptic Area Cells via NF- κ B Pathway Inhibition

Bruna R. B. Gomes¹, Gabriela Luna S. de Sousa², Daniela Ott³, Jolanta Murgott³, Marcelo V. de Sousa¹, Paulo E. N. de Souza⁴, Joachim Roth³ and Fabiane H. Veiga-Souza^{1,2*}

¹Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, ²School of Ceilandia, University of Brasília, Brasília, Brazil, ³Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University of Giessen, Giessen, Germany, ⁴Laboratory of Electron Paramagnetic Resonance, Institute of Physics, University of Brasília, Brasília, Brazil

Cytoglobin (Cygb) is a hexacoordinate protein, associated with the transport of oxygen, nitric oxide scavenging, tumor suppression and protection against oxidative stress and inflammation. This protein is expressed in brain areas including the preoptic area (POA) of the anterior hypothalamus, the region responsible for the regulation of body temperature. In this study, we show that Cygb is upregulated in the rat hypothalamus 2.5 h and 5 h after intravenous administration of lipopolysaccharide (LPS). We investigated the effect of treatment with Cygb in POA primary cultures stimulated with LPS for 4 h. The levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were measured and the results showed that Cygb reduced the concentrations of both cytokines. We further observed a decrease in immunoreactivity of the inflammatory transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B), but not NF-IL6 and STAT3, in the nucleus of Cygb-treated POA cells. These findings suggest that Cygb attenuates the secretion of IL-6 and TNF- α in LPS-stimulated POA primary cultures *via* inhibition of the NF- κ B signaling pathway, indicating that this protein might play an important role in the control of neuroinflammation and fever.

Keywords: cytoglobin, neuroinflammation, fever, preoptic area, primary culture, hypothalamus

OPEN ACCESS

Edited by:

Carlos B. Duarte,
University of Coimbra, Portugal

Reviewed by:

Chiara Parisi,
Institute of Cell Biology (CNR), Italy
Esperanza Bas Infante,
University of Miami, United States

*Correspondence:

Fabiane H. Veiga-Souza
fhveiga@unb.br

Received: 15 August 2019

Accepted: 28 November 2019

Published: 12 December 2019

Citation:

Gomes BRB, de Sousa GLS, Ott D, Murgott J, de Sousa MV, de Souza PEN, Roth J and Veiga-Souza FH (2019) Cytoglobin Attenuates Neuroinflammation in Lipopolysaccharide-Activated Primary Preoptic Area Cells via NF- κ B Pathway Inhibition. *Front. Mol. Neurosci.* 12:307. doi: 10.3389/fnmol.2019.00307

INTRODUCTION

Systemic administration of lipopolysaccharide (LPS) induces a number of brain-controlled sickness responses, such as anorexia, adipsia, reduced locomotor activity, and fever (Dantzer et al., 1998; Damm et al., 2013). LPS binds to the Toll-like receptor (TLR) member TLR4 in cells of both the peripheral and central nervous system, triggering intracellular cascades of events. These include activation of pro-inflammatory transcription factors, and production and release of several mediators, such as cytokines, chemokines, and prostaglandins (PGs), which are implicated in the aforementioned brain-controlled sickness responses (Damm et al., 2013; Roth and Blatteis, 2014; Zampronio et al., 2015).

Using high-resolution mass spectrometry-based quantitative proteomics, we recently demonstrated that during LPS and PG E₂-induced fever an orchestrated response, involving changes of several proteins associated with inflammatory and metabolic pathways, occurs in the hypothalamus of rats (Firmino et al., 2018). Among the inflammatory pathway components activated, we detected mitogen-activated protein kinases, nuclear factor- κ B (NF- κ B), arachidonic acid, adenylate cyclase, and calcium signaling. In addition to the proteins related to these well-known inflammatory pathways, we have identified a distinct protein that is not directly associated with any of these classical pathways, but significantly increases after induction of fever by both LPS and by PGE₂. This protein, named cytoglobin (Cygb), shows features that support its potential involvement in neuroinflammation and fever regulation.

Cygb is a hexacoordinate globin ubiquitously expressed in various organs and cell types (Burmester et al., 2000, 2002). In the brain, it has been found only in distinct areas, including the hypothalamic preoptic area (POA; Hundahl et al., 2010), which is known to be the major thermoregulatory center in mammals (Roth and Blatteis, 2014; Zampronio et al., 2015). At a subcellular level, Cygb is expressed in the nucleus, mitochondria, cytoplasm and neuronal dendrites and axons (Hundahl et al., 2010; Oleksiewicz et al., 2011).

Cygb has been implicated in oxygen transport, nitric oxide scavenging, tumor suppression and protection against oxidative stress and inflammation (Ou et al., 2018; Yassin et al., 2018). Consistent with its described functions, the expression of Cygb is upregulated in conditions associated with hypoxia, oxidative stress and inflammation (Guo et al., 2007; Tae et al., 2017; Yassin et al., 2018).

Indeed, in a study of an alcoholic liver disease model, treatment with recombinant human Cygb significantly inhibited Kupffer cell (KC) proliferation and tumor necrosis factor- α (TNF- α) expression, in LPS-stimulated KCs. Cygb also inhibited LPS-induced NADPH oxidase activity and ROS, NO, and O₂^{•-} generation (Wen et al., 2017). In addition, Cygb-deficient mice exhibited increased inflammation (Thuy et al., 2015; Van Thuy et al., 2017), as well as increased expression of TNF- α mRNA and many genes associated with inflammation (Yassin et al., 2018). These findings suggest that Cygb has a protective role in inflammation. However, its effects on neuroinflammation, especially in the cells of the POA, have not been investigated. Therefore, the purpose of the present study was to validate the increase in hypothalamic Cygb expression after a pyrogenic dose of LPS, and to investigate its function by examining levels of inflammatory cytokines (TNF- α and interleukin-6, IL-6) and the activation of transcription factors such as NF-IL6, STAT3, and NF- κ B, in LPS-activated POA cells co-treated with recombinant rat Cygb.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Fever experiments were conducted in male and female Wistar rats (180–200 g). The study was carried out in accordance with the guidelines of the National Council for the Control of

Animal Experimentation (CONCEA) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute for Laboratory Animal Research (2011). The protocol was approved by the Animals Research Ethics Committee of the University of Brasília (approval number 60/2018). Animals were housed at 24 \pm 1°C, under 12:12 h light-dark cycle (lights on at 7 am), with free access to food chow and tap water.

For the preparation of primary cultures from the POA, Wistar rat pups (4–6 d old) of both sexes were obtained from an in-house breeding colony and used for all experiments, with parent animals originating from Charles River WIGA (Sulzfeld, Germany). Animal care, breeding, and experimental procedures were conducted according to the guidelines approved by the Hessian Ethics Committee (approval numbers GI 468_M and GI 487_M). Room temperature was maintained at 22 \pm 1°C with a relative humidity of 50%. Artificial lights were on from 7 am to 7 pm.

Core Temperature Measurement

Body core temperature was measured in conscious adult rats using data loggers (Subcue, Calgary, AB, Canada) as previously described (Gomes et al., 2018). To induce fever, rats received an intravenous injection of LPS at a dose of 5 μ g/kg, determined according to previous studies showing both a moderate febrile response induction (Gomes et al., 2018) and Cygb increase in the hypothalamus (Firmino et al., 2018). The animals were harvested by decapitation 2.5 h or 5 h after the LPS injection, and the hypothalami were dissected from the brain and immediately frozen at –80°C until further processing.

Western Blot Analysis

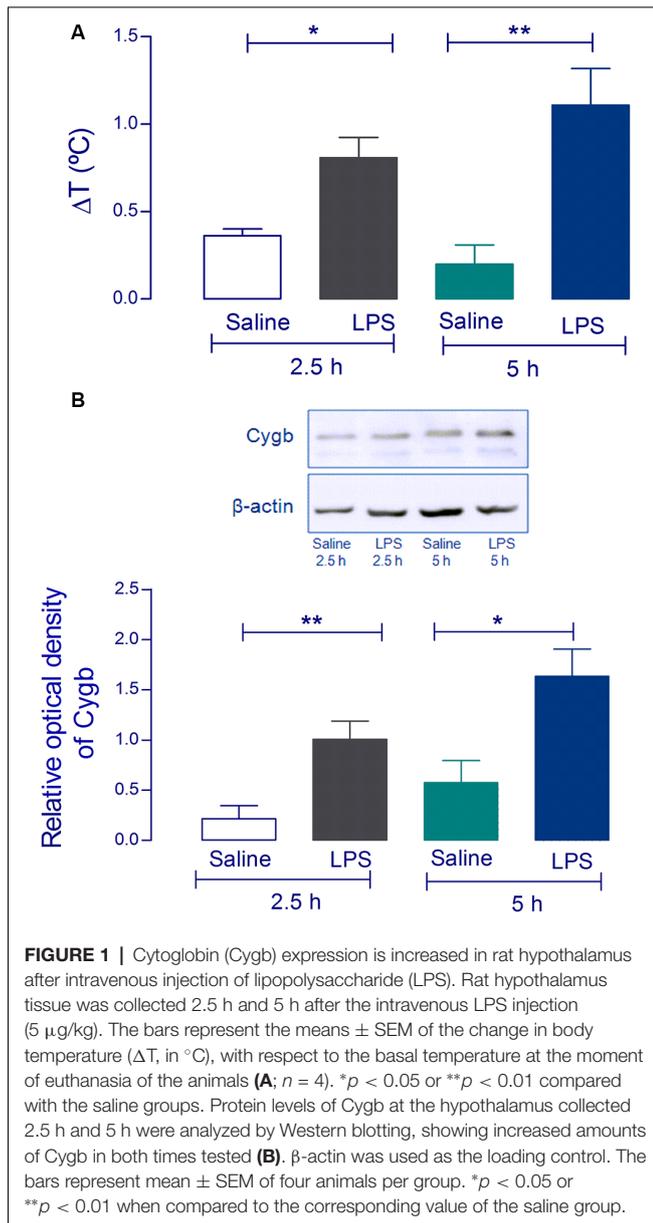
Freshly thawed hypothalamus samples were prepared as previously described (Firmino et al., 2018). Western blots for Cygb were performed using 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Thirty micogram of protein was loaded per well. We used the primary Cygb antibody raised in rabbit (1:1,000, Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, USA). Quantitative analysis was performed using ImageJ software (National Institute of Health). Data were normalized to β -actin levels.

Preoptic Area Primary Cell Cultures

Primary rat cultures were prepared as previously described (Soares et al., 2013). To stimulate the cells, they were incubated with LPS (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA; 10 μ g/ml) or recombinant rat Cygb (Cusabio Technology, Houston, TX, USA; 10 and 20 μ g/ml) for 4 h. The concentrations of LPS and Cygb used were based on previous studies (Wen et al., 2017; Leisengang et al., 2018). PBS was used as a negative control. The supernatant was harvested and stored at –45°C for later measurement of cytokines levels. Cells were used for immunocytochemistry.

Measurements of TNF- α and IL-6

Cytokines were measured in the supernatant of POA primary cell cultures. TNF- α and IL-6 levels were determined by bioassay, based on the cytotoxic effect of TNF- α on mouse fibrosarcoma cell line WEHI 164 subclone 13, and the dose-dependent growth



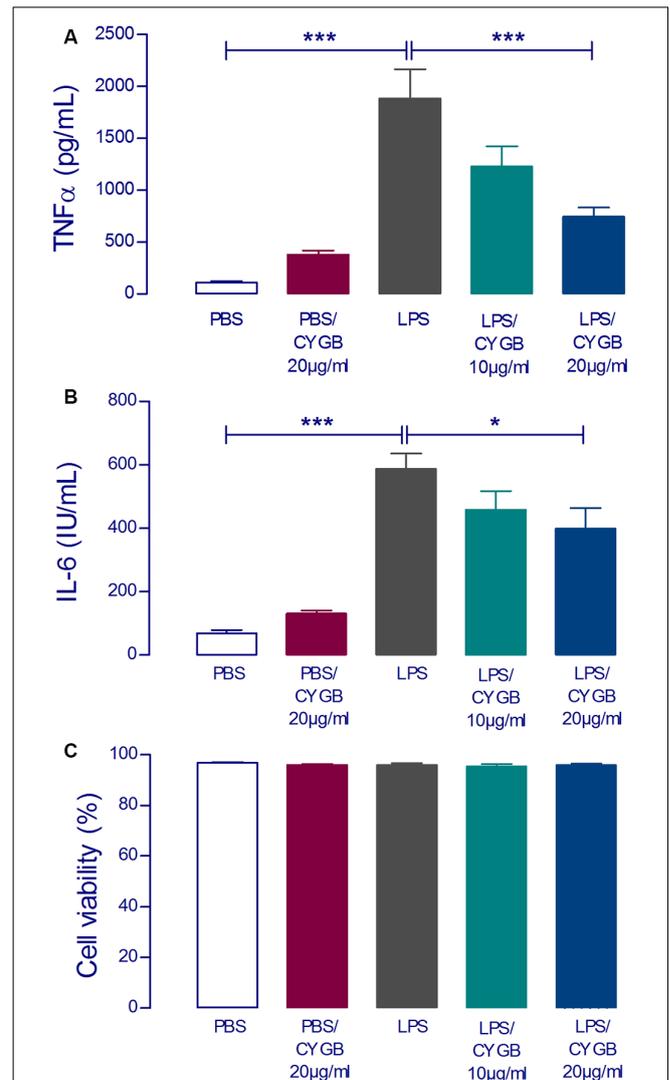
stimulation of IL-6 on the B9 hybridoma cell line, as previously reported (Ott et al., 2010; Soares et al., 2013; Simm et al., 2016). The detection limits of the assays, after considering the dilution of samples, proved to be 6.0 pg/ml for TNF- α and 3.0 IU/ml for IL-6 (Ott et al., 2010).

Cell Viability

Viability of primary POA cells after treatment with LPS and Cygb was determined using the trypan blue exclusion assay, as described by Perry et al. (1997).

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed in primary POA cells exposed to LPS for 4 h with or without Cygb. Nuclear translocation of the transcription factors NF-IL6 and NF- κ B in microglial cells and STAT3 in astrocytes was examined using



previously published protocols (Leisengang et al., 2018). Primary antibodies were used in the following concentrations: anti-NF-IL6 (1:4,000), anti-NF- κ B (1:2,000), anti-STAT3 (1:4,000), anti-GFAP (1:1,000), anti-ED-1 (1:1,000). For visualization of nuclei, DAPI was used (1:1,000). The cells were incubated with fluorophore-coupled secondary antisera (Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG, 1:500 and Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG, 1:2,000).

Cells were examined and photographed using a Nikon TMD epifluorescent microscope equipped with the appropriate filter sets. The intensity of one of the three color channels, which represented nuclei NF- κ B, NF-IL6, and STAT3 signals, was quantified using MetaMorph microscopic imaging software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

Statistics Analyses

All values are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses was performed using ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Differences were considered significant at a value of $p < 0.05$. The reproducibility of the data was confirmed by at least three independent experiments.

RESULTS

Cytoglobin Upregulation in Rat Hypothalamus After Injection of a Pyrogenic LPS-Dose

Using Western blot analysis, we first attempted to validate the increase of Cygb in the hypothalamus of animals challenged with a pyrogenic dose (5 μ g/kg) of intravenous LPS. The hypothalami were collected 2.5 and 5 h after injection when LPS had induced significant increases in core temperatures

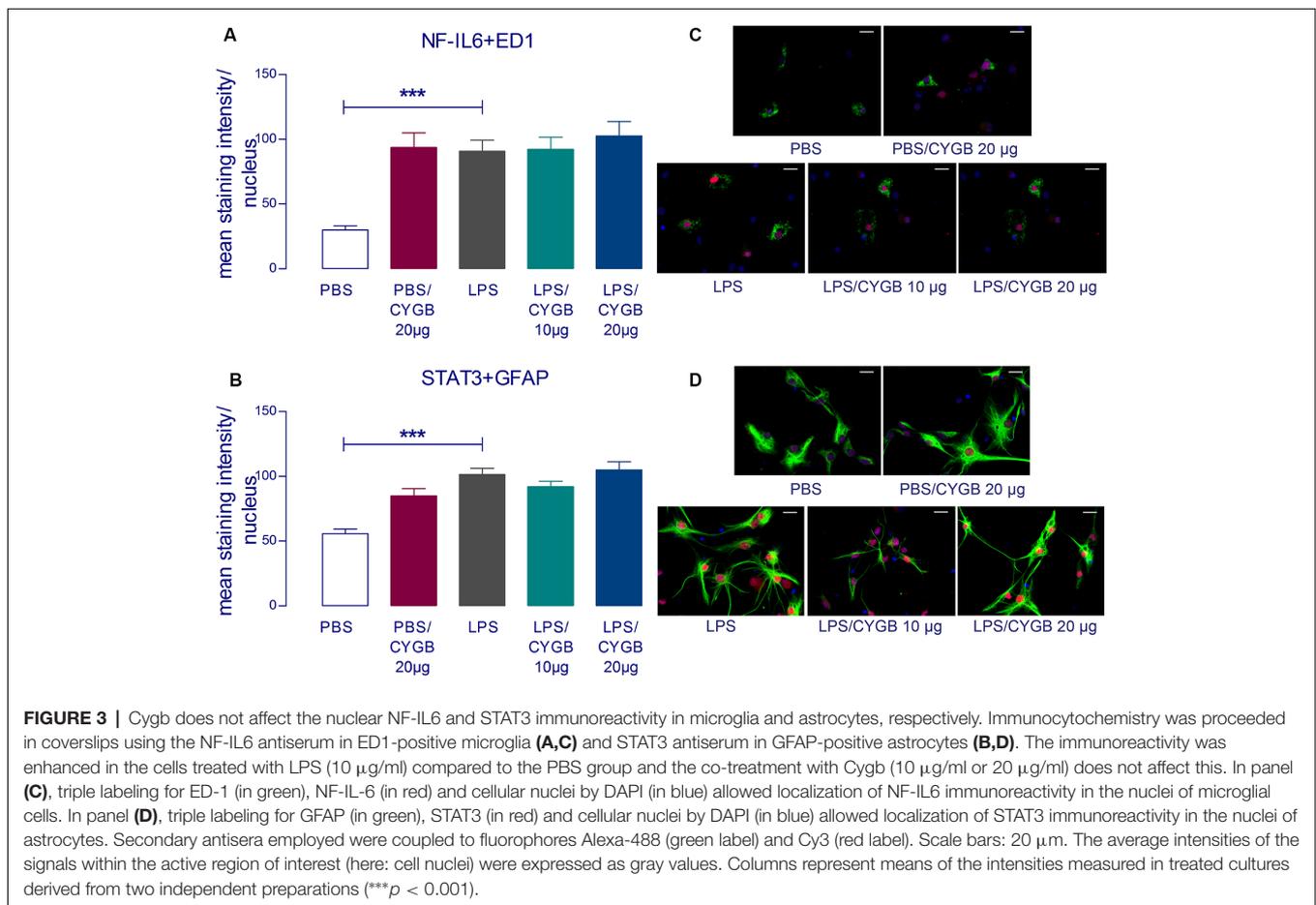
(Figure 1A). Consistent with our previous proteomic results (Firmino et al., 2018) we detected significant increases in Cygb in animals challenged with LPS, at both times tested (Figure 1B).

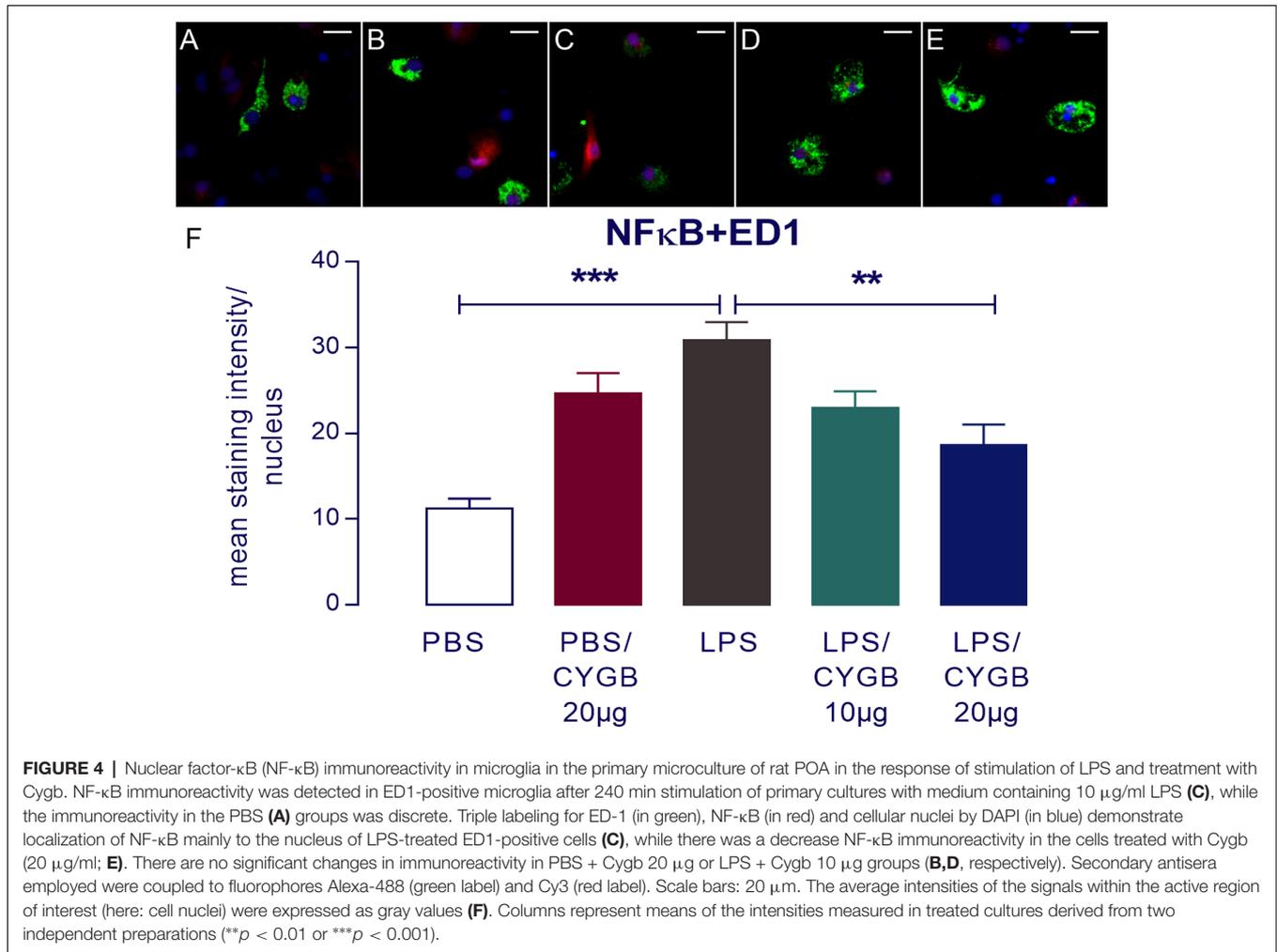
Cytoglobin Attenuates the Secretion of Cytokines Induced by LPS

To examine the effect of Cygb on LPS-induced neuroinflammatory responses in POA cells, levels of the inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 were measured (Figure 2). The secretion of both cytokines was significantly increased in LPS (10 μ g/ml) stimulated POA cells compared with the control group. This effect of LPS was attenuated by co-treatment of cells with Cygb (20 μ g/ml). The inhibitory effects on the secretion of IL-6 and TNF- α were not due to a reduction in cell viability since incubation with Cygb did not change this parameter, compared to the control group (Figure 2C).

Cytoglobin Regulates the Activation of NF- κ B After LPS Treatment

LPS-induced cytokine secretion by hypothalamic cells occurs *via* activation of inflammatory transcription factors (reviewed by Rummel, 2016). As expected, POA cells stimulated with LPS for





4 h showed increased immunoreactivity for NF-IL6, STAT3, and NF- κ B, when compared to the PBS group (Figures 3, 4). As Cygb reduced TNF- α and IL-6 secretion, we investigated whether these inhibitory effects were due to a change in the activation of transcription factors. We found that co-treatment of POA cells with LPS and Cygb did not alter immunoreactivity for NF-IL6 and STAT3, but significantly decreased the intensity of NF- κ B signals in microglial cells (Figure 4). This result suggests that Cygb exerts an anti-neuroinflammatory effect by inhibiting the NF- κ B signaling pathway.

Surprisingly, we also observed increased immunoreactivity for all transcription factors in the Cygb + PBS group when compared to PBS alone (Figures 3, 4). In line with this observation, there was a strong tendency for higher cytokine concentrations in the supernatants of cells treated with Cygb + PBS, when compared to PBS alone. Still, this effect was not significant (Figure 2) and the inhibitory effect of Cygb on LPS-induced release of cytokines was manifest in each of the independent experiments. Since the recombinant rat Cygb used in the present study was expressed in *E. coli*, we cannot exclude the possibility that some residual level of endotoxin was still present and caused the effect of Cygb on nuclear

immunoreactivity of transcription factors. Despite this, our results show undoubtedly that Cygb was able to reduce NF- κ B signal intensity induced by LPS.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated the anti-neuroinflammatory effect of Cygb in LPS-activated POA-cells by attenuation of pro-inflammatory cytokine secretion by inhibition of the NF- κ B pathway. In addition, we confirmed previous proteomic results by showing up-regulation of Cygb after animals were challenged with LPS (Firmino et al., 2018).

Cygb belongs to a family of globins (Burmester et al., 2000, 2002) and is expressed in the POA of the hypothalamus (Hundahl et al., 2010), which is known to be the major thermoregulatory center in mammals (Roth and Blatteis, 2014; Zampronio et al., 2015). Our results from Western blot analyses showed that Cygb is increased at 2.5 h and 5 h after intravenous administration of LPS. These times are compatible with the characteristic peaks of LPS-induced fever (Romanovsky et al., 1998). These findings validate our mass spectrometry-based proteomics data that showed upregulation of Cygb in the hypothalamus after

animals were challenged with LPS and PGE₂ (Firmino et al., 2018). Taken together, these data compelled us to explore the role of Cygb in the regulation of neuroinflammation, using LPS-stimulated POA primary cultures.

Cygb was first identified in the 2000s, as a ubiquitously protein with a potential protective function during conditions of nitro-oxidative stress (Burmester et al., 2002; Trent and Hargrove, 2002). Accumulating recent evidence suggests a complex interplay between nitro-oxidative stress and inflammation (Varga et al., 2015; Milatovic et al., 2017), and the study of endogenous antioxidants, such as Cygb, is important for understanding endogenous anti-inflammatory pathways. Systemic exposure to insults, such as toxins or bacterial infection, triggers an inflammatory response associated with the release of inflammatory mediators, such as free radicals, cytokines, and chemokines (Milatovic et al., 2017). As a NO scavenger, Cygb has been reported as an anti-inflammatory and antitumor agent (De Backer et al., 2018; Yassin et al., 2018). Ou et al. (2018) showed that Cygb prevents atherosclerosis by functioning as an NO dioxygenase enzyme and ROS scavenger, favoring the protection of the body against unbalanced homeostasis.

In the present study, we identified a decrease in levels of TNF- α and IL-6 in the supernatant of POA primary cultures after treatment with Cygb, revealing that this protein can regulate the neuroinflammation induced by LPS. Using a model of colitis in mice, Yassin et al. (2018) observed that Cygb-deficient mice developed more severe inflammation and that TNF- α increases Cygb mRNA expression in colonic epithelial cells, which might support a role for Cygb as a cytoprotective protein during inflammation. In addition, Cygb-deficient mice show elevated TNF- α and IL-6 in tumor and non-tumor tissue of the liver and lung (Thuy et al., 2011). These findings indicate that Cygb deficiency can trigger inflammation, which may contribute to increased susceptibility to cancer development (Roh et al., 2003; Park et al., 2010; Tsukamoto et al., 2018).

Our results indicate that Cygb did not change the nuclear immunoreactivity profile of the transcription factors STAT3 and NF-IL6 induced by LPS. However, we detected a significant reduction in immunoreactivity for NF- κ B in cultures treated with Cygb. NF- κ B is a transcription factor activated by TLR agonists and cytokines, such as TNF- α , and is thought to be a key regulator of neuroinflammation (Mincheva-Tasheva and Soler, 2013) and fever, since NF- κ B-deficient mouse do not develop a fever after LPS injection (Kozak et al., 2006; Rummel, 2016). Accordingly, substances that can inhibit NF- κ B activation are target candidates for the development of therapies to treat neuroinflammation and fever.

One limitation of the current investigation is that in the POA primary cell culture model, there is a considerable loss of endothelial cells during cell preparation, making it impossible

to analyze the effect of Cygb on the levels of PGE₂, an essential mediator of fever, since it is mainly produced by endothelial cells (Eskilsson et al., 2017). An additional limitation is that the amount of samples produced by the POA primary cells is insufficient to validate changes in cytokines and NF- κ B by other methods such as Western blot.

In summary, we confirm that in the experimental model of fever induced by LPS, hypothalamic Cygb protein levels are increased. To investigate the functional role of Cygb, we used an *in vitro* model of primary POA cell cultures. Of note, Cygb attenuates the secretion of IL-6 and TNF- α , *via* inhibition of the NF- κ B signaling pathway. In future studies, we intend to measure the levels of PGE₂, as well as to validate the regulatory effect of Cygb on cytokines and transcription factors in animals treated with Cygb. In addition, it would be of interest to determine the interplay between antioxidative and anti-inflammatory actions of Cygb, to further examine its potential as a therapeutic target for the control of neuroinflammation and fever.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animals Research Ethics Committee of the University of Brasília (approval number 60/2018).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FV-S conceived the project. BG, DO, JR and FV-S conceived and designed the experiments. BG, GS, DO, JM and FV-S performed the experiments. BG, DO, JM, JR and FV-S analyzed the data. BG and FV-S wrote the manuscript. MS, PS, DO and JR edited the manuscript. MS and PS contributed with advice and discussion. All authors approved the final version of the manuscript.

FUNDING

The present study was supported by the Federal District Research Support Foundation (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal; FAPDF grants 00193-00000106/2019-75, 193.001.073/2015 and 193.001.730/2017). BG is a recipient of a scholarship from CNPq (162092/2017-2) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001.

REFERENCES

- Burmester, T., Ebner, B., Weich, B., and Hankeln, T. (2002). Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol. Biol. Evol.* 19, 416–421. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004096
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S., and Hankeln, T. (2000). A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* 407, 520–523. doi: 10.1038/35035093
- Damm, J., Harden, L. M., Gerstberger, R., Roth, J., and Rummel, C. (2013). The putative JAK-STAT inhibitor AG490 exacerbates LPS-fever, reduces sickness

- behavior and alters the expression of pro- and anti-inflammatory genes in the rat brain. *Neuropharmacology* 71, 98–111. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.014
- Dantzer, R., Bluthé, R. M., Gheusi, G., Cremona, S., Layé, S., Parnet, P., et al. (1998). Molecular basis of sickness behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856, 132–138. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08321.x
- De Backer, J., Razzokov, J., Hammerschmid, D., Mensch, C., Hafideddine, Z., Kumar, N., et al. (2018). The effect of reactive oxygen and nitrogen species on the structure of cytoglobin: a potential tumor suppressor. *Redox Biol.* 19, 1–10. doi: 10.1016/j.redox.2018.07.019
- Eskilsson, A., Matsuwaki, T., Shionoya, K., Mirrasekhian, E., Zajdel, J., Schwaninger, M., et al. (2017). Immune-induced fever is dependent on local but not generalized prostaglandin E₂ synthesis in the brain. *J. Neurosci.* 37, 5035–5044. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3846-16.2017
- Firmino, M., Weis, S. N., Souza, J. M. F., Gomes, B. R. B., Mól, A. R., Mortari, M. R., et al. (2018). Label-free quantitative proteomics of rat hypothalamus under fever induced by LPS and PGE₂. *J. Proteomics* 187, 182–199. doi: 10.1016/j.jprot.2018.07.018
- Gomes, B. R. B., Firmino, M., Jorge, J. S., Ferreira, M. L. O., Rodovalho, T. M., Weis, S. N., et al. (2018). Increase of reactive oxygen species in different tissues during lipopolysaccharide-induced fever and antipyresis: an electron paramagnetic resonance study. *Free Radic. Res.* 52, 351–361. doi: 10.1080/10715762.2018.1425549
- Guo, X., Philipsen, S., and Tan-Un, K.-C. (2007). Study of the hypoxia-dependent regulation of human CYGB gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 145–150. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.108
- Hundahl, C. A., Allen, G. C., Hannibal, J., Kjaer, K., Rehfeld, J. F., Dewilde, S., et al. (2010). Anatomical characterization of cytoglobin and neuroglobin mRNA and protein expression in the mouse brain. *Brain Res.* 1331, 58–73. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.056
- Kozak, W., Wrotek, S., and Kozak, A. (2006). Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases and nuclear factor- κ B. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R871–R880. doi: 10.1152/ajpregu.00408.2005
- Leisegang, S., Ott, D., Murgott, J., Gerstberger, R., Rummel, C., and Roth, J. (2018). Primary cultures from rat dorsal root ganglia: responses of neurons and glial cells to somatosensory or inflammatory stimulation. *Neuroscience* 394, 1–13. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.10.018
- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., and Montine, T. J. (2017). “Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity,” in *Reproductive and Developmental Toxicology* (Elsevier), 1051–1061.
- Mincheva-Tasheva, S., and Soler, R. M. (2013). NF- κ B signaling pathways. *Neuroscientist* 19, 175–194. doi: 10.1177/1073858412444007
- Oleksiewicz, U., Liloglou, T., Field, J. K., and Xinarianos, G. (2011). Cytoglobin: biochemical, functional and clinical perspective of the newest member of the globin family. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3869–3883. doi: 10.1007/s00018-011-0764-9
- Ott, D., Murgott, J., Rafalzik, S., Wuchert, F., Schmalenbeck, B., Roth, J., et al. (2010). Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. *Brain Res.* 1363, 93–106. doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.083
- Ou, L., Li, X., Chen, B., Ge, Z., Zhang, J., Zhang, Y., et al. (2018). Recombinant human cytoglobin prevents atherosclerosis by regulating lipid metabolism and oxidative stress. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 23, 162–173. doi: 10.1177/1074248417724870
- Park, E. J., Lee, J. H., Yu, G.-Y., He, G., Ali, S. R., Holzer, R. G., et al. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* 140, 197–208. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.052
- Perry, S. W., Epstein, L. G., and Gelbard, H. A. (1997). *in situ* trypan blue staining of monolayer cell cultures for permanent fixation and mounting. *Biotechniques* 22, 1020–1024. doi: 10.2144/97226bm01
- Roh, M., Gary, B., Song, C., Said-Al-Naief, N., Tousson, A., Kraft, A., et al. (2003). Overexpression of the oncogenic kinase Pim-1 leads to genomic instability. *Cancer Res.* 63, 8079–8084.
- Romanovsky, A. A., Kulchitsky, V. A., Simons, C. T., and Sugimoto, N. (1998). Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? *Am. J. Physiol.* 275, R332–R338. doi: 10.1152/ajpregu.1998.275.1.r332
- Roth, J., and Blatteis, C. M. (2014). Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental lps fever. *Compr. Physiol.* 4, 1563–1604. doi: 10.1002/cphy.c130033
- Rummel, C. (2016). Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. *Brain. Behav. Immun.* 54, 1–14. doi: 10.1016/j.bbi.2015.09.003
- Simm, B., Ott, D., Pollatzek, E., Murgott, J., Gerstberger, R., Rummel, C., et al. (2016). Effects of prostaglandin E₂ on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic nucleus. *Neuroscience* 313, 23–35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.034
- Soares, D. M., Ott, D., Melo, M. C. C., Souza, G. E. P., and Roth, J. (2013). Chemokine ligand (CCL)-3 promotes an integrated febrile response when injected within pre-optic area (POA) of rats and induces calcium signaling in cells of POA microcultures but not TNF- α or IL-6 synthesis. *Brain Behav. Immun.* 34, 120–129. doi: 10.1016/j.bbi.2013.08.005
- Tae, B., Oliveira, K. C., Conceição, R. R., da Valenti, V. E., de Souza, J. S., Laureano-Melo, R., et al. (2017). Evaluation of globins expression in brain, heart and lung in rats exposed to side stream cigarette smoke. *Environ. Toxicol.* 32, 1252–1261. doi: 10.1002/tox.22321
- Thuy, L. T. T., Matsumoto, Y., Thuy, T. T., Van Hai, H., Suoh, M., Urahara, Y., et al. (2015). Cytoglobin deficiency promotes liver cancer development from hepatosteatosis through activation of the oxidative stress pathway. *Am. J. Pathol.* 185, 1045–1060. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.12.017
- Thuy, L. T. T., Morita, T., Yoshida, K., Wakasa, K., Iizuka, M., Ogawa, T., et al. (2011). Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 179, 1050–1060. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.006
- Trent, J. T., and Hargrove, M. S. (2002). A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 277, 19538–19545. doi: 10.1074/jbc.m201934200
- Tsakamoto, H., Fujieda, K., Senju, S., Ikeda, T., Oshiumi, H., and Nishimura, Y. (2018). Immune-suppressive effects of interleukin-6 on T-cell-mediated anti-tumor immunity. *Cancer Sci.* 109, 523–530. doi: 10.1111/cas.13433
- Van Thuy, T. T., Thuy, L. T. T., Yoshizato, K., and Kawada, N. (2017). Possible involvement of nitric oxide in enhanced liver injury and fibrogenesis during cholestasis in cytoglobin-deficient mice. *Sci. Rep.* 7:41888. doi: 10.1038/srep41888
- Varga, Z. V., Giricz, Z., Liaudet, L., Haskó, G., Ferdinandy, P., and Pachter, P. (2015). Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 232–242. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.06.030
- Wen, J., Wu, Y., Wei, W., Li, Z., Wang, P., Zhu, S., et al. (2017). Protective effects of recombinant human cytoglobin against chronic alcohol-induced liver disease *in vivo* and *in vitro*. *Sci. Rep.* 7:41647. doi: 10.1038/srep41647
- Yassin, M., Kissow, H., Vainer, B., Joseph, P. D., Hay-Schmidt, A., Olsen, J., et al. (2018). Cytoglobin affects tumorigenesis and the expression of ulcerative colitis-associated genes under chemically induced colitis in mice. *Sci. Rep.* 8:6905. doi: 10.1038/s41598-018-24728-x
- Zampronio, A. R., Soares, D. M., and Souza, G. E. P. (2015). Central mediators involved in the febrile response: effects of antipyretic drugs. *Temperature* 2, 506–521. doi: 10.1080/23328940.2015.1102802

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Gomes, de Sousa, Ott, Murgott, de Sousa, de Souza, Roth and Veiga-Souza. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Embora a febre seja uma condição clínica comum, as bases moleculares envolvidas em sua gênese, manutenção e no efeito de fármacos antipiréticos ainda são pouco entendidas e apesar da aparente grande oferta de antipiréticos, são relatados muitos casos de hipersensibilidade, intolerância e ineficácia relacionadas a esses fármacos. Dessa forma, percebe-se a necessidade de mais pesquisas na área de desenvolvimento de novos antipiréticos com mecanismos de ação diferentes dos atuais para suprir os casos de intolerância aos fármacos existentes.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a relação do NO no processo febril, explorando por diferentes perspectivas mecanismos envolvidos na gênese e no controle da febre que possam estar interligados ao NO.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que essa molécula é importante na resposta febril, já que a injeção de LPS leva ao aumento de NO no sangue, hipotálamo, TAM e fígado, tecidos relacionados a febre. Também demonstramos que o sequestro de NO pelo complexo Fe-DETC aboliu a febre e que a inibição da desnitrosilação aumenta a temperatura corporal dos animais, indicando que o NO é fundamental para a gênese da febre e esse mecanismo pode ser mediado por sinalização via SNO.

A análise de proteínas potencialmente envolvidas com o metabolismo do óxido nítrico é uma ferramenta importante para que possamos entender como este mediador pode regular o processo inflamatório. Por isso, foi escolhido validar o envolvimento da Cygb no processo inflamatório e febril, utilizando modelo *in vitro* em células hipotalâmicas. A Cygb é uma proteína envolvida no sequestro de NO, demonstrando assim um papel protetor contra o estresse nitrosativo. Em nosso modelo, demonstramos o papel anti-inflamatório dessa proteína, inferindo então que o uso de substâncias que auxiliam no controle do estresse nitrosativo são potenciais alvos para a terapia anti-inflamatória e antipirética, além de apontar que o NO é realmente um mediador que pode ser relacionado ao processo inflamatório.

É necessário ainda aprofundar o estudo sobre a citoglobina, para confirmar *in vivo* seu papel antipirético. Para isso, pretendemos injetar a proteína em animais para testar as respostas do tratamento em vivo. O gargalo encontrado nesse tipo de experimento é o alto custo da proteína recombinante.

Além do estudo de proteínas específicas, é importante identificar também outras proteínas que possam estar reguladas pelo NO no processo febril e na antipirese promovida por fármacos. O aumento da temperatura promovido pelo inibidor da GSNOR indica que o mecanismo de nitrosilação/desnitrosilação é importante para a regulação do processo febril. Por isso, faz-se necessária a análise de proteínas nitrosiladas no hipotálamo, utilizando técnica de enriquecimento desta modificação pós-traducional, seguida por análise proteômica por espectrometria de massas. Com isso, espera-se identificar proteínas reguladas pelo NO durante o processo febril.

Em outra frente de trabalho, é necessário avançar os estudos em cima do ainda desconhecido mecanismo de ação da dipirona e do paracetamol. Os resultados desse trabalho mostraram que apesar desses fármacos reduzirem a concentração de NO, a co-administração de L-arginina, um doador de NO, não foi capaz de alterar o efeito desses fármacos. Assim, é necessário verificar a possibilidade desses medicamentos estarem atuando na via por uma inibição das NOS. Para isso, pretende-se medir a expressão da NOS usando a técnica de PCR, além de medir a atividade dessas enzimas nos hipotálamos dos animais tratados com dipirona ou paracetamol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, F. E. M. *et al.* Targeting Keap-1/Nrf-2 pathway and cytoglobin as a potential protective mechanism of diosmin and pentoxifylline against cholestatic liver cirrhosis. **Life Sciences**, v. 207, p. 50–60, 15 ago. 2018.

ANAND, P.; STAMLER, J. S. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 3, p. 233–244, 24 mar. 2012.

AYOUB, S. S.; FLOWER, R. J. Loss of hypothermic and anti-pyretic action of paracetamol in cyclooxygenase-1 knockout mice is indicative of inhibition of cyclooxygenase-1 variant enzymes. **European Journal of Pharmacology**, v. 861, p. 172609, out. 2019.

BACHTELL, R. K.; TSIVKOVSKAIA, N. O.; RYABININ, A. E. Identification of temperature-sensitive neural circuits in mice using c-Fos expression mapping. **Brain Research**, v. 960, n. 1–2, p. 157–164, 17 jan. 2003.

BACKER, J. DE *et al.* The effect of reactive oxygen and nitrogen species on the structure of cytoglobin: A potential tumor suppressor. **Redox Biology**, v. 19, p. 1–10, 24 out. 2018.

BAKER, B. H. *et al.* Association of Prenatal Acetaminophen Exposure Measured in Meconium With Adverse Birth Outcomes in a Canadian Birth Cohort. **Frontiers in Pediatrics**, v. 10, p. 413, 5 abr. 2022.

BJÖRKMAN, R. *et al.* Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. **Pain**, v. 57, n. 3, p. 259–264, jun. 1994.

BLATTEIS, C. M. Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? **Journal of Thermal Biology**, v. 28, n. 1, p. 1–13, jan. 2003.

BLONDER, J. P. *et al.* Pharmacologic inhibition of S-nitrosoglutathione reductase protects against experimental asthma in BALB/c mice through attenuation of both bronchoconstriction and inflammation. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 14, n. 1, p. 3, 10 dez. 2014.

BOTTING, R. M. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 57, n. SUPPL. 5, p. 113–124, nov. 2006.

BOULANT, J. A. Role of the Preoptic-Anterior Hypothalamus in Thermoregulation and Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. Supplement_5, p. S157–S161, 1 out. 2000.

BRANCO, L. G. S.; SORIANO, R. N.; STEINER, A. A. Gaseous Mediators in Temperature Regulation. *In: Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2014. p. 1301–1338.

BRUNTON, L. L. *et al.* **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. [s.l.: s.n.].

BUJALSKA, M.; GUMUŁKA, W. S. Effect of cyclooxygenase and NO synthase inhibitors on antinociceptive action of acetaminophen. **Polish journal of pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 341–50, jun. 1994.

CAZACU, I.; MOGOSAN, C.; LOGHIN, F. Safety issues of current analgesics: an update. **Medicine and Pharmacy Reports**, v. 88, n. 2, p. 128–136, 29 abr. 2015.

COLAGIOVANNI, D. B. *et al.* A nonclinical safety and pharmacokinetic evaluation of N6022: A first-in-class S-nitrosoglutathione reductase inhibitor for the treatment of asthma. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 115–124, 1 fev. 2012.

CONTI, B. Cytokines and fever. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1–3, p. 1433, 1 maio 2004.

COSTA, D.; VIEIRA, A.; FERNANDES, E. Dipyrone and aminopyrine are effective scavengers of reactive nitrogen species. **Redox Report**, v. 11, n. 3, p. 136–142, 19 jun. 2006.

CRISTIANA, F.; NINA, Z.; ELE, A. Homocysteine in Red Blood Cells Metabolism - Pharmacological Approaches. *In: Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology*. [s.l.] InTech, 2012. p. 32–68.

DANTONIO, V. *et al.* Nitric oxide and fever: immune-to-brain signaling vs. thermogenesis in chicks. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 310, n. 10, p. R896–R905, 15 maio 2016.

DEI ZOTTI, F. *et al.* Redox regulation of nitrosyl-hemoglobin in human erythrocytes. **Redox Biology**, v. 34, p. 101399, 1 jul. 2020.

DEI ZOTTI, F.; LOBYSHEVA, I. I.; BALLIGAND, J.-L. Nitrosyl-hemoglobin formation in rodent and human venous erythrocytes reflects NO formation from the vasculature in vivo. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200352, 11 jul. 2018.

DIKALOV, S.; FINK, B. ESR Techniques for the Detection of Nitric Oxide In Vivo and in Tissues. *In: Methods in Enzymology*. [s.l.: s.n.]. p. 597–610.

DUAN, B.; XU, X. Z. S. How to Break a Fever: A Feedback Circuit for Body Temperature Control. **Neuron**, v. 103, n. 2, p. 179–181, jul. 2019.

EL-RADHI, A. S. Pathogenesis of Fever. *In: Clinical Manual of Fever in Children*. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 53–68.

ENGSTRÖM RUUD, L. *et al.* Acetaminophen reduces lipopolysaccharide-induced fever by inhibiting cyclooxygenase-2. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 124–129, ago. 2013.

EPSTEIN, F. H.; MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002–2012, 30 dez. 1993.

ESKILSSON, A. *et al.* Immune-induced fever is mediated by IL-6 receptors on brain endothelial cells coupled to stat3-dependent induction of brain endothelial prostaglandin synthesis. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 48, p. 15957–15961, 26 nov. 2014.

ESLAMIMEHR, S. *et al.* Association of prenatal acetaminophen use and acetaminophen metabolites with DNA methylation of newborns: analysis of two consecutive generations of the Isle of Wight birth cohort. **Environmental Epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 19 mar. 2022.

EVANS, S. S.; REPASKY, E. A.; FISHER, D. T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 6, p. 335–349, 15 jun. 2015.

FABRICIO, A. S. C. *et al.* The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 3, p. R671–R677, mar. 2005.

FARAH, C.; MICHEL, L. Y. M.; BALLIGAND, J.-L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 5, p. 292–316, 1 maio 2018.

FELEDER, C.; PERLIK, V.; BLATTEIS, C. M. Preoptic nitric oxide attenuates endotoxic fever in guinea pigs by inhibiting the POA release of norepinephrine. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 3, p. R1144–R1151, set. 2007.

FIRMINO, M. *et al.* Label-free quantitative proteomics of rat hypothalamus under fever induced by LPS and PGE2. **Journal of Proteomics**, v. 187, p. 182–199, 15 set. 2018.

FLOWER, R. J. The development of COX2 inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 179–191, mar. 2003.

GARAMI, A.; STEINER, A. A.; ROMANOVSKY, A. A. Fever and hypothermia in systemic inflammation. *In: Handbook of Clinical Neurology*. [s.l.: s.n.]. v. 157p. 565–597.

GOMES, B. R. B. **Análise da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a febre e a antipirese em ratos**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2017.

_____. Increase of reactive oxygen species in different tissues during lipopolysaccharide-induced fever and antipyresis: an electron paramagnetic resonance study. **Free Radical Research**, v. 52, n. 3, p. 351–361, 4 mar. 2018.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 5, p. 963–991, maio 1990.

GOURINE, A. V. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 26, n. 4, p. 835–841, jul. 1995.

GRAHAM, G. G. *et al.* The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. **Inflammopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 201–232, 30 jun. 2013.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 54, n. 4, p. 469–87, dez. 2003.

HARDEN, L. M. *et al.* Interleukin (IL)-6 and IL-1 β act synergistically within the brain to induce sickness behavior and fever in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 6, p. 838–849, ago. 2008.

HASDAY, J. D.; FAIRCHILD, K. D.; SHANHOLTZ, C. The role of fever in the infected host. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1891–1904, dez. 2000.

HINZ, B.; CHEREMINA, O.; BRUNE, K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 2, p. 383–390, 20 fev. 2008.

HOANG, D. V. *et al.* Cytoglobin attenuates pancreatic cancer growth via scavenging reactive oxygen species. **Oncogenesis**, v. 11, n. 1, p. 23, 3 dez. 2022.

INABA, H. *et al.* Antipyretic analgesic drugs have different mechanisms for regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes and macrophages. **Nitric Oxide**, v. 44, p. 61–70, 30 jan. 2015.

IUPS THERMAL COMMISSION. Glossary of terms for thermal physiology. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, n. 1, p. 75–106, jan. 2003.

IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1–3, p. 1977, 1 maio 2004.

JIANG, J. *et al.* In Vivo Production of Nitric Oxide in Rats after Administration of Hydroxyurea. **Molecular Pharmacology**, v. 52, n. 6, p. 1081–1086, 1 dez. 1997.

KAWADA, N. *et al.* Characterization of a Stellate Cell Activation-associated Protein (STAP) with Peroxidase Activity Found in Rat Hepatic Stellate Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 27, p. 25318–25323, 6 jan. 2001.

KHAN, M. *et al.* Targeting GSNOR for functional recovery in a middle-aged mouse model of stroke. **Brain Research**, v. 1741, p. 146879, 15 ago. 2020.

KLESCHYOV, A. L. *et al.* Spin Trapping of Vascular Nitric Oxide Using Colloid Fe(II)-Diethyldithiocarbamate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 2, p. 672–677, 28 ago. 2000.

KORHONEN, R. *et al.* Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. **Current Drug Target -Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 4, p. 471–479, 1 ago. 2005.

KOZAK, W.; WROTEK, S.; KOZAK, A. Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor- κ B. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 4, p. R871–R880, abr. 2006.

KUMAR, S.; SINGH, R. K.; BHARDWAJ, T. R. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, p. 182–201, jan. 2017.

LEE, J.-J. *et al.* Blocking NF- κ B Activation May Be an Effective Strategy in the Fever Therapy. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 53, n. 5, p. 367–375, out. 2003.

LENNICKE, C. *et al.* Redox proteomics: Methods for the identification and enrichment of redox-modified proteins and their applications. **PROTEOMICS**, v. 16, n. 2, p. 197–213, jan. 2016.

LI, H. *et al.* Characterization of the Mechanism and Magnitude of Cytoglobin-mediated Nitrite Reduction and Nitric Oxide Generation under Anaerobic Conditions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 43, p. 36623–36633, 19 out. 2012.

LI, S. *et al.* Acetaminophen: Antipyretic or hypothermic in mice? In either case, PGHS-1b (COX-3) is irrelevant. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 85, n. 3–4, p. 89–99, mar. 2008.

LI, Z. *et al.* Kupffer cell-generated PGE 2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 5, p. R1262–R1270, maio 2006.

LIMA, B. *et al.* S -Nitrosylation in Cardiovascular Signaling. **Circulation Research**, v. 106, n. 4, p. 633–646, 5 mar. 2010.

LIU, Q. *et al.* GSNOR facilitates antiviral innate immunity by restricting TBK1 cysteine S-nitrosation. **Redox Biology**, v. 47, p. 102172, 1 nov. 2021.

LIU, R. *et al.* Identification of S-nitrosylated proteins in postmortem pork muscle using modified biotin switch method coupled with isobaric tags. **Meat Science**, v. 145, n. July, p. 431–439, nov. 2018.

LIU, X. *et al.* Cytoglobin regulates blood pressure and vascular tone through nitric oxide metabolism in the vascular wall. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14807, 10 abr. 2017.

LONG, N. C. *et al.* Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 259, n. 4, p. R724–R728, 1 out. 1990.

_____. Systemic injection of TNF- α attenuates fever due to IL-1 β and LPS in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 263, n. 5, p. R987–R991, 1 nov. 1992.

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflammation Research**, v. 45, n. 6, p. 308–311, jun. 1996.

LUCA, B. DE; MONDA, M.; SULLO, A. Changes in eating behavior and thermogenic activity following inhibition of nitric oxide formation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 268, n. 6, p. R1533–R1538, 1 jun. 1995.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 323–350, 28 abr. 1997.

MALVAR, D. D. C. *et al.* The antipyretic effect of dipyron is unrelated to inhibition of PGE₂ synthesis in the hypothalamus. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1401–1409, mar. 2011.

_____. Dipyron metabolite 4-MAA induces hypothermia and inhibits PGE₂ -dependent and -independent fever while 4-AA only blocks PGE₂ -dependent fever. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 15, p. 3666–3679, ago. 2014.

MARTINS, J. M. *et al.* Involvement of PGE₂ and RANTES in *Staphylococcus aureus*-induced fever in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 9, p. 1456–1465, 1 nov. 2012.

MATHAI, C. *et al.* Emerging perspectives on cytoglobin, beyond NO dioxygenase and peroxidase. **Redox Biology**, v. 32, p. 101468, 1 maio 2020.

MATSUWAKI, T. *et al.* Involvement of interleukin-1 type 1 receptors in lipopolysaccharide-induced sickness responses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 66, p. 165–176, 1 nov. 2017.

MINHAS, R.; BANSAL, Y.; BANSAL, G. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 3, p. 823–855, 10 maio 2020.

MNATSAKANYAN, R. *et al.* Proteome-wide detection of S-nitrosylation targets and motifs using bioorthogonal cleavable-linker-based enrichment and switch technique. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 2195, 16 dez. 2019.

MORRISON, S. F. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. **Autonomic Neuroscience**, v. 196, p. 14–24, abr. 2016.

MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J.; TUPONE, D. Central Neural Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Energy Expenditure. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 741–756, 6 maio 2014.

MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K. Central Mechanisms for Thermoregulation. **Annual Review of Physiology**, v. 81, n. 1, p. 285–308, 10 fev. 2019.

NAKAMURA, T. *et al.* Aberrant Protein S-Nitrosylation in Neurodegenerative Diseases. **Neuron**, v. 78, n. 4, p. 596–614, 5 maio 2013.

NAKAMURA, Y. *et al.* Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 3137–3146, dez. 2005.

NAKAYAMA, T. *et al.* Thermal stimulation of electrical activity of single units of the preoptic region. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 204, n. 6, p. 1122–1126, 1 jun. 1963.

Oka T. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. **Front Biosci**, v. 9, p. 3046-3057, set. 2004.

OSAKA, T. The EP3 and EP4 Receptor Subtypes both Mediate the Fever-producing Effects of Prostaglandin E2 in the Rostral Ventromedial Preoptic Area of the Hypothalamus in Rats. **Neuroscience**, v. 494, p. 25–37, jul. 2022.

OU, L. *et al.* Recombinant Human Cytoglobin Prevents Atherosclerosis by Regulating Lipid Metabolism and Oxidative Stress. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 2, p. 162–173, 27 mar. 2018.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 1 jan. 2007.

PEROTTI, C. A. A. *et al.* Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 11, p. 1381–1387, nov. 1999.

PRADO, W. A.; SCHIAVON, V. F.; CUNHA, F. Q. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 441, n. 1–2, p. 57–65, 19 abr. 2002.

PRAJITHA, N.; ATHIRA, S. S.; MOHANAN, P. V. Comprehensive biology of antipyretic pathways. **Cytokine**, v. 116, p. 120–127, abr. 2019.

PRITCHARD, M. T.; LI, Z.; REPASKY, E. A. Nitric oxide production is regulated by fever range thermal stimulation of murine macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 3, p. 630–638, 6 set. 2005.

PROTSIV, M. *et al.* Decreasing human body temperature in the United States since the Industrial Revolution. **eLife**, v. 9, 7 jan. 2020.

QUE, L. G. *et al.* Effects of Arginase Isoforms on NO Production by nNOS. **Nitric Oxide**, v. 6, n. 1, p. 1–8, fev. 2002.

_____. Effect of the S-nitrosoglutathione reductase inhibitor N6022 on bronchial hyperreactivity in asthma. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 6, n. 2, p. 322–331, 1 jun. 2018.

REYNAERT, N. L. *et al.* Nitric oxide represses inhibitory κ B kinase through S-nitrosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 24, p.

8945–8950, 15 jun. 2004.

ROSS, G. *et al.* Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 4, p. 1395–1402, 1 abr. 2003.

ROTH, J. *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase attenuates lipopolysaccharide-induced fever without reduction of circulating cytokines in guinea-pigs. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 436, n. 6, p. 858–862, 12 out. 1998.

_____. Molecular Aspects of Fever and Hyperthermia. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 229–245, maio 2009.

ROTH, J.; BLATTEIS, C. M. Mechanisms of Fever Production and Lysis: Lessons from Experimental LPS Fever. *In*: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2014. v. 4p. 1563–1604.

ROWLAND, L. K. *et al.* Putative tumor suppressor cytoglobin promotes aryl hydrocarbon receptor ligand-mediated triple negative breast cancer cell death. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 4, p. 6004–6014, 18 abr. 2019.

RUMMEL, C. Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 54, p. 1–14, maio 2016.

SAAD, S. S. T. *et al.* Nitric oxide is involved in ibuprofen preemptive analgesic effect in the plantar incisional model of postsurgical pain in mice. **Neuroscience Letters**, v. 614, p. 33–38, 12 fev. 2016.

SARAMAGO, E. A. *et al.* Molecular hydrogen potentiates hypothermia and prevents hypotension and fever in LPS-induced systemic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 75, p. 119–128, 1 jan. 2019.

SAXENA, N. *et al.* S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) inhibitor as an immune modulator in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 121, p. 57–68, 1 jun. 2018.

SCHNEIDERS, J. *et al.* The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 48, p. 147–164, ago. 2015.

SECRETARIA EXECUTIVA DA CÂMARA DE REGULAÇÃO DO MERCADO DE MEDICAMENTOS - SCMED. **Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico 2019/20**. Brasília: [s.n.].

SENBEL, A. M.; ABDELMONEIM, L.; OMAR, A. G. Celecoxib modulates nitric oxide and reactive oxygen species in kidney ischemia/reperfusion injury and rat aorta model of hypoxia/reoxygenation. **Vascular Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 24–31, 25 jul. 2014.

SIMON, E. Nitric oxide as a peripheral and central mediator in temperature regulation. **Amino Acids**, v. 14, n. 1–3, p. 87–93, mar. 1998.

SOARES, D. M. *et al.* Cyclooxygenase-independent mechanism of ibuprofen-induced antipyresis: the role of central vasopressin V1 receptors. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 670–681, dez. 2011.

SORIANO, R. N. *et al.* Glucocorticoids downregulate systemic nitric oxide synthesis and counteract overexpression of hepatic heme oxygenase-1 during endotoxin tolerance. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 91, n. 10, p. 861–865, out. 2013.

SOUZA, G. E. P. DE *et al.* A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats. **Inflammation Research**, v. 51, n. 1, p. 24–32, jan. 2002.

STAMLER, J. S.; HESS, D. T. Nascent nitrosylases. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 1024–1026, 24 nov. 2010.

STAMLER, J. S.; LAMAS, S.; FANG, F. C. Nitrosylation: The Prototypic Redox-Based Signaling Mechanism. **Cell**, v. 106, n. 6, p. 675–683, 21 set. 2001.

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, 1 fev. 2002.

STOMBERSKI, C. T.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 30, n. 10, p. 1331–1351, abr. 2019.

SUN, X. *et al.* Discovery of S -Nitrosoglutathione Reductase Inhibitors: Potential Agents for the Treatment of Asthma and Other Inflammatory Diseases. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 5, p. 402–406, 12 maio 2011.

TAN, C. L. *et al.* Warm-Sensitive Neurons that Control Body Temperature. **Cell**, v. 167, n. 1, p. 47–59.e15, 22 set. 2016.

TAN, C. L.; KNIGHT, Z. A. Regulation of Body Temperature by the Nervous System. **Neuron**, v. 98, n. 1, p. 31–48, abr. 2018.

TANSEY, E. A.; JOHNSON, C. D. Recent advances in thermoregulation. **Advances in Physiology Education**, v. 39, n. 3, p. 139–148, set. 2015.

TEGEDER, I. *et al.* Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. **Neuroscience Letters**, v. 332, n. 2, p. 146–150, 31 out. 2002.

THUY, L. T. T. *et al.* Cytoglobin Deficiency Promotes Liver Cancer Development from Hepatosteatosis through Activation of the Oxidative Stress Pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 4, p. 1045–1060, abr. 2015.

TRETTIN, A. *et al.* Effects of Paracetamol on NOS, COX, and CYP Activity and on Oxidative Stress in Healthy Male Subjects, Rat Hepatocytes, and Recombinant NOS. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

TSUGE, K. *et al.* Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases. **International Immunology**, v. 31, n. 9, p. 597–606, 23 ago. 2019.

ÜÇAL, M. *et al.* Comprehensive Profiling of Modulation of Nitric Oxide Levels and Mitochondrial Activity in the Injured Brain: An Experimental Study Based on the Fluid Percussion Injury Model in Rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 34, n. 2, p. 475–486, 15 jan. 2017.

Ushikubi F. *et al.* Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**, v. 17, n. 395(6699), p. 281-284, set. 1998.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.

VANIN, A. F. *et al.* Why iron–dithiocarbamates ensure detection of nitric oxide in cells and tissues. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 4, p. 295–311, dez. 2006.

VANIN, A. F.; HUISMAN, A.; FAASSEN, E. E. VAN. Iron dithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection: Pitfalls and successes. *In: Methods in Enzymology*. [s.l.: s.n.]. v. 359p. 27–42.

WALTER, E. J. *et al.* The pathophysiological basis and consequences of fever. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 200, 14 dez. 2016.

WEI, H. *et al.* Effect of cytoglobin overexpression on extracellular matrix component synthesis in human tenon fibroblasts. **Biological Research**, v. 52, n. 1, p. 23, 16 dez. 2019.

YAMASHIRO, L. H.; SOUZA, G. E. P. DE; MELO SOARES, D. DE. Role of CINC-1 and CXCR2 receptors on LPS-induced fever in rats. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 471, n. 2, p. 301–311, 22 fev. 2019.

YASSIN, M. *et al.* Cytoglobin affects tumorigenesis and the expression of ulcerative colitis-associated genes under chemically induced colitis in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6905, 2 dez. 2018.

ZAHN, J. *et al.* Metamizole Use in Children: Analysis of Drug Utilisation and Adverse Drug Reactions at a German University Hospital between 2015 and 2020. **Pediatric Drugs**, v. 24, n. 1, p. 45–56, 8 jan. 2022.

ZAMPONIO, A. R.; SOARES, D. M.; SOUZA, G. E. P. Central mediators involved in the febrile response: effects of antipyretic drugs. **Temperature**, v. 2, n. 4, p. 506–521, 2 out. 2015.

ANEXOS

ANEXO 1: APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL

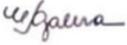

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 13 de dezembro de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "ESTUDO DO ESTRESSE NITROSATIVO DURANTE A FEBRE E A ANTIPIRESE EM RATOS.", Protocolo n.º 100/2017, sob responsabilidade da Professora Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus* (90 machos e 90 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/10/2017 a 31/07/2021.


UnB


Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB


CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO 2: PRORROGAÇÃO DE PRAZO – CEUA



Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 20 de julho de 2021.

DECLARAÇÃO – Prorrogação de Prazo

Declaramos que a prorrogação de prazo do projeto intitulado “**ESTUDO DO ESTRESSE NITROSATIVO DURANTE A FEBRE E A ANTIPIRESE EM RATOS**”, Protocolo n.º 100/2017 e SEI 23106.069996/2021-28, sob responsabilidade da Professora Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, foi avaliado e aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus*, (90 machos e 90 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/10/2017 a 31/07/2022.




Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

PRODUÇÃO DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

- Participação em eventos científicos:

50th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Apresentação de pôster: *Electron Paramagnetic Resonance Detection of Nitric Oxide Produced In Different Tissues During Fever And Antipyresis*. 2018. (Congresso).

III Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular. Apresentação oral: *Increase of nitric oxide levels during LPS induced fever is reversed by treatment with dipyrene and paracetamol but not by other antipyretics*. 2018. (Simpósio).

51th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Apresentação de pôster: *Cytoglobin attenuates neuroinflammation in lipopolysaccharide-activated primary preoptic area cells via NFκB pathway inhibition*.(2019). (Congresso).

Menção honrosa de melhores painéis.

- Artigos publicados em periódico:

GOMES, BRUNA R. B.; FIRMINO, MARINA; JORGE, JARDESON S.; FERREIRA, MARIA L. O.; RODOVALHO, THAYS M.; WEIS, SIMONE N.; SOUZA, GLORIA E. P.; MORAIS, PAULO C.; SOUSA, MARCELO V.; SOUZA, PAULO E. N.; VEIGA-SOUZA, FABIANE H. Increase of reactive oxygen species in different tissues during lipopolysaccharide-induced fever and antipyresis: an electron paramagnetic resonance study. *FREE RADICAL RESEARCH*, p. 1-11, 2018.

Fator de impacto: 4,148

FIRMINO, MARINA ; WEIS, SIMONE N. ; SOUZA, JAQUES M.F.; **GOMES, BRUNA R.B.** ; MÓL, ALAN R. ; MORTARI, MÁRCIA R. ; SOUZA, GLORIA E.P. ; COCA, GUILHERME C. ; WILLIAMS, THOMAS C.R. ; FONTES, WAGNER ; RICART, CARLOS ANDRÉ O. ; DE SOUSA, MARCELO V.; VEIGA-SOUZA, FABIANE H. . Label-free quantitative proteomics of rat hypothalamus under fever induced by LPS and PGE2. *Journal of Proteomics*, v. 187, p. 182-199, 2018.

Fator de impacto: 4,044

GOMES, BRUNA R. B.; DE SOUSA, GABRIELA LUNA S. ; OTT, DANIELA ; MURGOTT, JOLANTA ; DE SOUSA, MARCELO V. ; DE SOUZA, PAULO E. N. ; ROTH, JOACHIM ; VEIGA-SOUZA, FABIANE H. . Cytoglobin Attenuates Neuroinflammation in Lipopolysaccharide-Activated Primary Preoptic Area Cells via NF- κ B Pathway Inhibition. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 12, p. 307, 2019.

Fator de impacto: 5,639

GUIMARÃES, NATÁLIA C.; ALVES, DÉBORA S. ; VILELA, WEMBLEY R. ; DE-SOUZA-FERREIRA, EDUARDO ; **GOMES, BRUNA R.B.** ; OTT, DANIELA ; MURGOTT, JOLANTA ; E. N. DE SOUZA, PAULO ; DE SOUSA, MARCELO V. ; GALINA, ANTONIO ; ROTH, JOACHIM ; FABRO DE BEM, ANDREZA ; VEIGA-SOUZA, FABIANE H. . Mitochondrial pyruvate carrier as a key regulator of fever and neuroinflammation. *BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY*, v. 92, p. 90-101, 2021.

Fator de impacto: 7,217