



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**GABRIELA LUNA SOARES DE SOUSA**

**ENVOLVIMENTO DA CITOGLOBINA EXPRESSA NO HIPOTÁLAMO NO  
DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DA FEBRE E NEUROINFLAMAÇÃO**

**BRASÍLIA, 2020.**

GABRIELA LUNA SOARES DE SOUSA

**ENVOLVIMENTO DA CITOGLOBINA EXPRESSA NO HIPOTÁLAMO NO  
DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DA FEBRE E NEUROINFLAMAÇÃO**

Monografia de conclusão de curso apresentada como  
requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico.  
Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

**Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza**

**Co- Orientadora: Me. Bruna Rafaela Bezerra Gomes**

BRASÍLIA, 2020.

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

SS725e Soares de Sousa, Gabriela Luna  
Envolvimento da Citoglobina expressa no hipotálamo no desenvolvimento e controle da febre e neuroinflamação / Gabriela Luna Soares de Sousa; orientador Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza; co-orientador Bruna Rafaela Bezerra Gomes. -- Brasília, 2020.  
43 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2020.

1. Citoglobina. 2. Febre. 3. Neuroinflamação. I. Veiga de Souza, Fabiane Hiratsuka, orient. II. Gomes, Bruna Rafaela Bezerra, co-orient. III. Título.

GABRIELA LUNA SOARES DE SOUSA

**ENVOLVIMENTO DA CITOGLOBINA EXPRESSA NO HIPOTÁLAMO NO  
DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DA FEBRE E NEUROINFLAMAÇÃO**

**BANCA EXAMINADORA**

*Fabiane R. V. de Souza*

---

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza  
(FCE/ Universidade de Brasília)

*Bruna Rafaela B. Gomes*

---

Co-Orientadora: Me. Bruna Rafaela Bezerra Gomes  
(UNB/ Universidade de Brasília)

*Mani Funez*

---

Profa. Dra. Mani Indiana Funez  
(FCE/ Universidade de Brasília)

*Eduardo A. Ferreira*

---

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferreira  
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2020.

A Deus, por toda a força para seguir em frente. Aos meu pais por todo apoio, incentivo e compreensão. Aos meus avós Gutemberg e Marleide, por sempre se orgulharem de mim.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por tudo que tem feito em minha vida.

A minha mãe por toda a dedicação desde o vestibular para entrar na universidade até os dias finais da graduação, obrigada por ser minha melhor amiga e companheira. Obrigada por todo o esforço, apoio e tempo dedicados a mim, você é a melhor.

Ao meu Pai por sempre me incentivar a estudar, e ser a minha inspiração diária de profissional, obrigada por ser minha base e me apoiar em tudo que faço.

Ao restante da minha família por toda a confiança, em especial minha prima Isabela que sempre foi meu porto seguro e minha verdadeira irmã em todos os momentos da minha vida.

Ao meu Padrinho Antônio que mesmo de longe sempre foi presente na minha vida e na jornada acadêmica, obrigada por todos os conselhos e conversas.

Ao meu namorado Felipe por toda a compreensão nos momentos de estresse e por me acalmar nas horas difíceis.

A minha orientadora Fabiane por toda paciência, dedicação e confiança. Obrigada por me apresentar a pesquisa científica e ter sido responsável pelo meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço também pela oportunidade de conhecer a pessoa maravilhosa que você é.

A minha co-orientadora Bruna por toda ajuda nos experimentos inclusive aos fins de semana, nos relatórios, projetos, e no tcc em si. Obrigada por todos os conselhos e dedicação à sua "IC".

A todos do grupo de pesquisa principalmente Natália e Débora por todos os experimentos, conversas e viagens, que ajudaram a tornar tudo mais leve.

A todos os amigos do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, pelas conversas e discussões sobre os experimentos.

A todos os professores da graduação em especial Jamila, Tatiana e Thays por serem uma inspiração como profissionais.

Aos meus chefes de estágio Tarsila e Charles por todo aprendizado que me passaram durante a jornada de trabalho.

Ao meu quarteto fantástico Carla, Patrícia e Tayane por estarem presentes em todos os momentos bons como as viagens e festas na casa da Carla ou ruins

chorando por conta de análise instrumental farmacêutica. Tenho muita sorte de ter conhecido vocês meninas, muito obrigada por todo apoio na graduação e fora dela.

As minhas amigas Luíza (amiga de festa) e Lídia por me acompanharem nas horas difíceis da faculdade e sempre estarem presente nos momentos de lazer, inclusive nos happy hours, festinhas inesperadas na casa da Luiza e quando decidimos rodar por todos os bares de Brasília em uma noite.

À todas as pessoas que contribuíram mesmo que indiretamente para a minha formação.

E por último, mas não menos importante a Universidade de Brasília pela oportunidade de aprender com os melhores professores, e ao CNPq pela bolsa concedida.

## RESUMO

A citoglobina (Cygb) é uma proteína descoberta há pouco mais de uma década por um grupo de pesquisadores no Japão. Desde a sua descoberta, muitos estudos foram realizados para compreender seu papel funcional, entretanto este permanece pouco esclarecido. Esta proteína é expressa em diversas áreas do cérebro, incluindo a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOHA), a região responsável pela regulação da temperatura corporal. A febre é um dos sinais clínicos de várias doenças e sua detecção pode estar relacionada a processos infecciosos e inflamatórios. Embora a febre seja uma situação comum em várias doenças, as bases moleculares envolvidas em sua gênese, manutenção e no efeito de fármacos antitérmicos ainda são pouco esclarecidos. Estudos de neuroproteômica realizados por nosso grupo indicaram que durante a febre induzida por prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> ou lipopolissacarídeo (LPS) ocorre aumento na abundância hipotalâmica de algumas proteínas, dentre elas a Cygb. Sendo assim, com o objetivo de validar o aumento da abundância de Cygb na febre e investigar o seu papel na neuroinflamação, utilizamos o modelo de febre induzida por LPS em ratos, realizamos o Western Blot e mostramos que Cygb é regulada positivamente no hipotálamo de ratos. Investigamos também o efeito do tratamento com Cygb em culturas primárias da APOHA de ratos filhotes estimuladas com LPS por 4 h. Os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) foram medidos e os resultados mostraram que Cygb reduziu as concentrações de ambas as citocinas, mostrando ser um possível alvo terapêutico para o controle da febre e neuroinflamação.

**PALAVRAS-CHAVE:** TNF $\alpha$ ; IL-6; LPS; APOHA.



## ABSTRACT

Cytoglobin is a protein discovered a little over a decade ago by a group of researchers in Japan. Since its discovery, many studies have been carried out to understand its functional role, but it remains unclear. This protein is expressed in areas of the brain, including the preoptic area of the anterior hypothalamus (POA), the region responsible for regulating body temperature. Fever is one of the clinical signs of several diseases and its detection may be related to infectious and inflammatory processes. Although fever is a common clinical condition, the molecular bases involved in its genesis, maintenance and the effect of antipyretic drugs are still poorly understood. Neuroproteomics studies performed in our laboratory indicated that during fever induced by PGE<sub>2</sub> and LPS there is an increase in the hypothalamic abundance of some proteins, including cytoglobin. Therefore, in order to validate the increased abundance of Cygb in fever and to investigate its role in neuroinflammation, we used the LPS-induced fever model in rats, we performed the Western Blot and showed that Cygb is positively regulated in the rat hypothalamus. We also investigated the effect of treatment with Cygb in primary cultures of POA from pup rats stimulated with LPS for 4 h. Levels of tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) were measured and the results showed that Cygb reduced the concentrations of both cytokines, showing to be a possible therapeutic target for the control of fever and neuroinflammation.

**KEYWORDS:** TNF $\alpha$ ; IL-6; LPS; APOHA.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	5
RESUMO .....	7
SUMÁRIO .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
TERMORREGULAÇÃO E FEBRE .....	12
PIROGÊNIOS ENDÓGENOS.....	15
ANTIPIRÉTICOS ENDÓGENOS.....	17
CITOGLOBINA (CYGB) .....	18
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
OBJETIVO GERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
ANIMAIS.....	23
CIRURGIA PARA IMPLANTE DE TRANSMISSORES NA CAVIDADE PERITONEAL .....	23
INDUÇÃO DA FEBRE .....	24
ANÁLISE POR WESTERN BLOT .....	24
CULTURAS DE CÉLULAS PRIMÁRIAS APOHA.....	24
MEDIDAS DO TNF $\alpha$ E DA IL-6 E VIABILIDADE CELULAR.....	25
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	25
5. RESULTADOS .....	26
AUMENTO DA ABUNDÂNCIA DE CYGB APÓS ESTIMULO DE LPS .....	26
CYGB ATENUA A SECREÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDAS POR LPS .....	27
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO.....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXOS .....	41
ANEXO 1- Aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal1	

ANEXO 2 – Publicação .....	42
----------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR PIRÓGENOS NA APOHA .....	13
FIGURA 2-ESTRUTURA QUÍMICA DO CORTISOL.....	18
FIGURA 3-VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DOS RATOS APÓS A INJEÇÃO INTRAVENOSA DE LPS .....	26
FIGURA 4-AUMENTO DA ABUNDÂNCIA DE CYGB NOS HIPOTÁLAMOS DE RATOS DESAFIADOS COM LPS.....	27
FIGURA 5-CYGB ATENUA A SECREÇÃO DE IL-6 E TNF $\alpha$ . .....	28

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\alpha$ -MSH – Alfa-melanocortina.

ANOVA – Análise de variância de uma via.

APOHA – Área pré-óptica do hipotálamo anterior.

COX – Ciclooxigenase.

Cygb- Citoglobina.

EPM – Erro padrão da média.

ICV – Intracerebroventricular.

IL-1 – Interleucina 1.

IL-1 $\alpha$  - Interleucina 1 alfa.

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta.

IL-6 – Interleucina 6.

IL-10 – Interleucina 10.

IP – Intraperitoneal.

IV – Intravenosa.

LPS – Lipopolissacarídeo.

MB- Mioglobina.

NO- Óxido Nítrico.

O<sub>2</sub> – Oxigênio.

PG – Prostaglandina.

PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>.

rhTNF - Fator de necrose tumoral alfa recombinante humano.

SNC – Sistema nervoso central.

TRL4 – *Toll like receptor 4*.

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 TERMORREGULAÇÃO E FEBRE

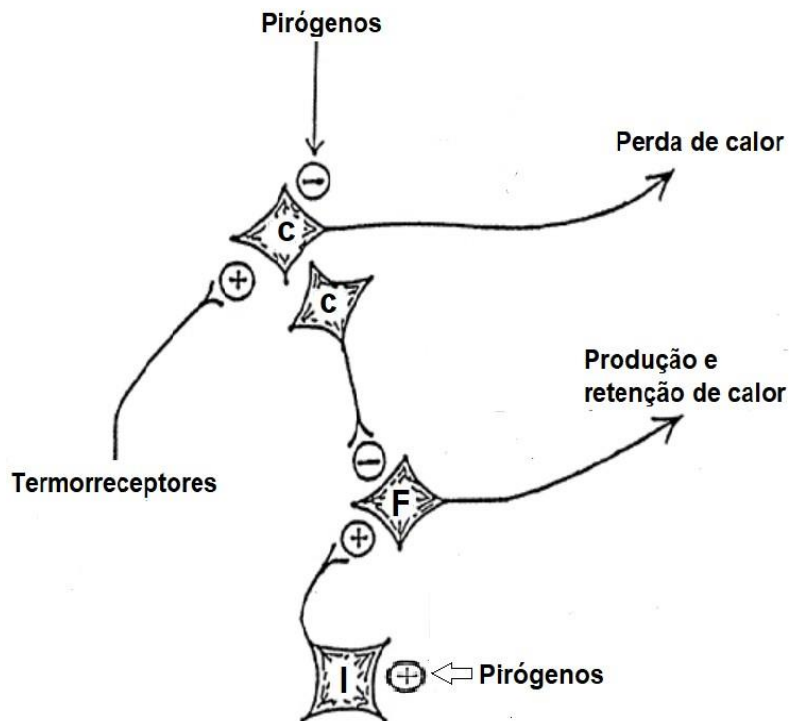
Termorregulação é o termo utilizado para referir-se a regulação da temperatura corporal. A temperatura corporal normal dos seres humanos é de cerca de 37 °C, podendo ocorrer algumas variações que são controladas pelo sistema nervoso central. Essas variações podem ocorrer ao longo do dia, pelo ritmo circadiano, ao longo do mês, por conta do ciclo menstrual e ao longo de toda a vida, principalmente durante o envelhecimento (TANSEY e JOHNSON, 2015).

A temperatura corporal é regulada principalmente pela área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOHA). Essa área integra informações de temperatura para orquestrar adaptações autônomas e comportamentais para manter o equilíbrio térmico (MORRISON, 2016; HELLER et al., 1978). A elucidação sobre a importância dessa área na termorregulação são advindas de estudos que envolveram experimentos de estimulação térmica do hipotálamo utilizando implantes de termódios, que são aparelhos perfundidos com água quente ou fria gerando variações de temperatura na área de interesse (BOULANT, 2000).

Além disso, a APOHA se comunica com algumas áreas efetoras específicas como o tronco cerebral e a medula espinhal para estimular as respostas termorregulatórias apropriadas para condições térmicas internas e ambientais, e quando essa região é sinapticamente conectada ao tronco cerebral inferior, a temperatura corporal é regulada com maior precisão (BOULANT, 2000).

Os neurônios da APOHA são sensíveis a mudanças sutis na temperatura e são capazes de receber estímulos somatossensoriais da pele e de termorreceptores da medula espinhal, podendo assim integrar as informações térmicas (BOULANT, 2000; TANSEY e JOHNSON, 2015). Essas informações térmicas são integradas no centro termorregulador que, em seguida, fornece comandos aos termoefetores periféricos para controlar a produção, manutenção ou a perda de calor (MORRISON e NAKAMURA, 2019).

Os neurônios pré-ópticos podem ser classificados em três tipos: sensíveis ao calor, sensíveis ao frio e insensíveis às mudanças de temperatura, como pode ser observado na Figura 1, que apresenta a atividade desses três tipos de neurônios. Os neurônios sensíveis ao calor, vão aumentar suas taxas de disparos quando há um aumento na temperatura, controlando assim a resposta de perda de calor, esses neurônios inibem sinapticamente os neurônios sensíveis ao frio e são afetados por pirógenos. Os neurônios sensíveis ao frio aumentam suas taxas de disparos quando há redução da temperatura, esses neurônios também desempenham um papel na produção de calor e nas respostas de retenção de calor. Já os neurônios insensíveis a mudanças na temperatura mostram poucas alterações nas taxas de disparos durante alterações da temperatura, mas podem estimular os neurônios sensíveis ao frio levando ao aumento da temperatura corporal. Através dos neurônios insensíveis a mudanças na temperatura os pirógenos estimulam os neurônios sensíveis ao frio e desenvolvem respostas de produção e retenção de calor (BOULANT, 2000).



**Figura 1- Resposta febril induzida por pirógenos na APOHA.** C: Neurônios sensíveis ao calor; F: Neurônios sensíveis ao frio; I: Neurônios insensíveis a variações na temperatura. (+) estimulação; (-) inibição. Adaptado de: BOULANT, 2000.

O sistema de termorregulação desempenha um papel importante na defesa contra infecções elevando a temperatura corporal, evento que chamamos de febre. A febre em latim significa 'calor', já a pirexia vem do grego que significa fogo ou febre. Alguns autores usam os termos de forma intercambiável, enquanto outros definem a 'febre' como uma temperatura alta causada pela ação de pirógenos termorregulatórios no hipotálamo (ZIMMERMAN e HANANIA, 2005).

A febre é uma condição clínica comum de diversas doenças fazendo parte dos mecanismos de defesa do corpo. Porém quando ocorrem desvios anormais nos mecanismos de termorregulação alterando significativamente a faixa de temperatura, podem ocorrer danos ao indivíduo. Por exemplo, uma temperatura corporal acima de 42 °C pode causar desnaturação proteica e deficiência na síntese de DNA provocando danos aos órgãos e disfunção neuronal. Além disso, se a temperatura corporal se mantém abaixo de 27 °C podem ocorrer alterações neuromusculares, cardiovasculares, hematológicas e respiratórias (TANSEY e JOHNSON, 2015).

A febre pode ser desencadeada partir da invasão do organismo por agentes infecciosos, dentre eles, leveduras, vírus e bactérias, os quais são chamados de pirogênios exógenos. O LPS, endotoxina presente na membrana externa de bactérias gram negativas, induz a febre por meio da ativação de receptores *toll like* tipo 4 (TLR-4) que são expressos por populações de células imunes inatas incluindo macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (EVANS, REPASKY e FISHER, 2015). Esses receptores são ativados por uma proteína de ligação que forma um complexo com o LPS, ativando uma cascata de transdução de sinal em macrófagos e outras células imunes que irão induzir a produção e a liberação de citocinas inflamatórias tais como as interleucinas (IL)-1 $\beta$ , de interferons e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). A partir desta liberação, haverá a indução da produção de PGE<sub>2</sub> que atua como o principal mediador da febre (BLATTEIS, 2006).

Tais mediadores levam a ativação dos mecanismos de produção e conservação de calor, por inibirem a atividade dos neurônios sensíveis ao calor, gerando mecanismos termogênicos (MORRISON e NAKAMURA, 2011).



## 1.2 PIROGÊNIOS ENDÓGENOS

Pirogênios endógenos são mediadores que estão presentes no organismo humano e são responsáveis por desencadear a febre. Os pirogênios endógenos, dentre os quais destacam-se as citocinas, estimulam a produção de PG, principalmente a PGE<sub>2</sub>, que atuam no centro termorregulatório, resultando na febre. A produção da PGE<sub>2</sub> é catalisada por enzimas chamadas ciclooxygenases (COX) (WHO, 1993).

Citocinas são um grupo de várias proteínas de baixo peso molecular, que tem sua ação iniciada através da ligação a receptores específicos, provocando alterações da síntese do RNA e de proteínas em diferentes células do organismo, podendo agir no local onde são produzidas, em células próximas ou podem ser secretadas para circulação (SHEERAN e HALL, 1997). Dentre as citocinas pirogênicas principais podemos citar: interleucina 1 (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), o TNF $\alpha$  e a interleucina 6 (IL-6). (DINARELLO e BUNN, 1997).

IL-1 é uma molécula pirogênica e ativadora de linfócitos (DINARELLO, 1999). Após sua descrição, March et al (1985) revelaram dois compostos diferentes, a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Um estudo demonstrou que um subconjunto de proteínas NRL, chamado de NLRP1 seria capaz de organizar e oligomerizar em uma estrutura ativadora da cascata da caspase 1 promovendo a produção de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18. Essa estrutura oligomérica foi denominada inflamassoma e desde a sua descoberta outros inflamassomas foram descobertos incluindo o NLRP3 (MARTINON et al., 2002). Gross et al (2012), demonstraram que a IL-1 $\alpha$  é um importante indutor de produção de IL-6 na sinalização de neutrófilos durante experimento de indução de peritonite, indicando o importante papel da IL-1 $\alpha$  como polipeptídeo efetor no organismo na ativação do inflamassoma NLRP3 (complexo formado pela oligomerização de seqüência de leucina que controlam a produção de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18). Também foi visto que a IL-1 $\beta$  secretada atua sobre as células musculares lisas para a produção de IL-6 (LOPPNOW e LIBBY, 1990). Um estudo de Neeb et al, (2011) revelou que a IL-1 $\beta$  tem um papel na indução de febre

e da dor em células neuronais, ativando a COX-2 expressa na presença de um dano tecidual, formando PGE<sub>2</sub>, e causando febre.

Já a IL-6 é um importante mediador da resposta do hospedeiro à doença (CONTI, 2004). IL-6 interage com seus receptores nas células-alvo e desencadeia sua resposta ativando leucócitos e células T CD4. A febre é acompanhada pelo aparecimento de IL-6 no plasma (COCEANI et al., 1993). Estudos mostraram que após a administração subcutânea de LPS em ratos ocorre um aumento na concentração de IL-6 no soro (MILLER et al., 1997), além disso viram que a temperatura corporal é diminuída após a administração de soro anti-IL-6 (CARTMELL et al., 2000).

O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) é um citocina pró-inflamatória que desempenha um papel importante no sistema imunológico, principalmente durante a inflamação, proliferação celular, diferenciação e apoptose (BAUD e KARIN, 2001). Essa citocina é o principal mediador da inflamação aguda em resposta a bactérias Gram negativas, e é produzido principalmente por fagócitos mononucleares ativados por LPS (WANEBO, 1989). Um estudo sugeriu sua ação pirogênica já que a injeção de TNF $\alpha$  em ratos gerou aumento da temperatura (ROTHWELL, 1988). Em outro estudo foi observado que a injeção intracerebroventricular (ICV) de alta dose de LPS leva a elevação dos níveis de TNF $\alpha$  e IL-6 no líquido cefalorraquidiano (COCEANI et al., 1993). Similarmente, a administração IV de TNF $\alpha$  recombinante humano (rhTNF) em coelhos revelou que o potencial pirogênico do rhTNF está correlacionado com o aumento da produção de PGE<sub>2</sub> (NAKAMURA et al., 1988).

A PGE<sub>2</sub> produzida principalmente por células endoteliais, é considerada um importante mediador pirogênico da febre, (EVANS, REPASKY e FISHER, 2015) é advinda da transformação do ácido araquidônico em uma reação catalisada pela (COX-2) e pela PGE<sub>2</sub> sintetase-1 microsossomal. A PGE<sub>2</sub> é detectada pelos seus receptores nos neurónios pré-ópticos do hipotálamo, que por sua vez estão em contato com as regiões do cérebro responsáveis pela conservação e geração de calor (OAKLEY et al., 2011). Neste processo a PGE<sub>2</sub> induz, através da produção de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, o aumento do ponto de ajuste térmico hipotalâmico induzindo respostas vasoconstritoras e de contração muscular que conduzem à produção endógena de calor, causando a febre (GRADIZ e PINTO, 2013)

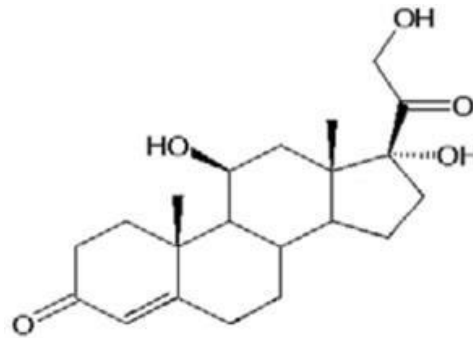
### 1.3 ANTIPIRÉTICOS ENDÓGENOS

Estudos revelaram que, além das citocinas pirogênicas, também existem mediadores que podem ser chamados de antipiréticos endógenos (KOZAK et al., 2006). Muitos antipiréticos endógenos que são moléculas que limitam o aumento da temperatura corporal ou mesmo reduzem a temperatura, foram identificados nos últimos 25 anos. Estes incluem alfa-melanocortina ( $\alpha$ -MSH), arginina vasopressina, glicocorticóides, e IL-10 (KOZAK et al., 2006).

A  $\alpha$ -MSH é um neuropeptídeo produzido a partir do processamento pós-traducional da pró-opiomelanocortina (BRZOSKA et al., 2008; BUTLER, 2006; CATANIA et al., 2000; MOUNTJOY et al., 1992). Em um estudo foi observado que  $\alpha$ -MSH administrado tanto periférico (intavenosa ou intragástrico) quanto centralmente (injeções ICV ou septal) age como um agente antipirético extremamente potente. A potência antipirética deste peptídeo foi comparada com o efeito do paracetamol (MURPHY e LIPTON., 1982).

A vasopressina, também conhecida como hormônio antidiurético, é um hormônio hipotalâmico com ação em células renais, hepatócitos e células vasculares, produzindo antidiurese, aumentando a gliconeogênese e atuando como um importante vasoconstritor (SACHS et al., 1969). Federico et al. (1992) demonstraram que a microinjeção de vasopressina no centro na amígdala medial reduz a febre induzida por PGE<sub>2</sub> demonstrando seu papel na febre.

Já os glicocorticoides são hormônios esteroides, sintetizados no córtex da glândula adrenal. O representante natural é o cortisol ou hidrocortisona (Figura 2) (DAMIANI et al., 2001). Os glicocorticoides apresentam poderosos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (BAVARESCO et al., 2005). Segundo Guyton e Hall., (1997) o cortisol atenua a febre, principalmente pelo fato de reduzir a liberação de IL-1 dos leucócitos.



**Figura 2-Estrutura química do Cortisol.** Estrutura química do Cortisol. Adaptado de: Goodman e Gilman, 2003.

A citocina anti-inflamatória IL-10, identificada por Fiorentino et al (1989), é um fator negativo crítico na regulação das respostas imunes. A redução de IL-10 leva a doenças inflamatórias (OUYANG et al., 2011). Camundongos nocaute para IL-10 demonstraram febre mais alta ao LPS do que os ratos de controle do tipo selvagem, e a injeção de IL-10 recombinante em camundongos, faz impedir a elevação da temperatura corporal induzida por LPS (LEON et al., 1999).

#### 1.4 CITOGLOBINA (Cygb)

A Cygb é uma proteína hexacoordenada pertencente à família das globinas (AKIOS et al., 2008). Ela foi originalmente identificada nas células estreladas hepáticas de ratos (KAWADA et al., 2001) e desde a sua descoberta, muitos estudos foram realizados na tentativa de compreender seu papel funcional, que permanece pouco esclarecido.

É sugerido que essa proteína seja um ancestral evolutivo da mioglobina (Mb) devido a suas semelhanças filogenéticas (BURMESTER; WEICH; HANKELN., 2002). Um estudo observou que as concentrações de Mb no músculo liso vascular são muito baixas, 40 vezes menores que as de Cygb (LAWRIE e LEDWARD., 2006), sugerindo um papel funcional mais amplo para a Cygb.

A família das globinas compreende pequenas proteínas contendo porfirina que se ligam reversivelmente ao O<sub>2</sub> por meio de um ferro (Fe<sup>2+</sup>), íon do grupo

prostético heme (WEBER e WINOGRADOW, 2001; WITTENBERG e WITTENBERG, 2003; BURMESTER e HANKELN, 2014). Na Cygb, o ferro heme é hexacoordenado através de um arranjo envolvendo os grupos imidazol de uma histidina proximal e distal (SUGIMOTO et al., 2004). Após a ligação de um ligante exógeno, como por exemplo, oxigênio (O<sub>2</sub>) ou óxido nítrico (NO), esse grupo imidazol distal é deslocado (SUGIMOTO et al., 2004). Dada a capacidade de se ligar ao O<sub>2</sub> e ao NO, Cygb foi sugerida como sendo capaz de neutralizar tanto a hipóxia celular quanto o estresse oxidativo (CHAKRABORTY; JOHN; NAG, 2014). Sabe-se que a Cygb protege as células da lesão mediada pelo estresse oxidativo (LI et al., 2007; FANG et al., 2011) e aumenta a taxa de sobrevivência, como demonstrado nas linhas celulares neuronais tratadas com oxidantes, células estreladas hepáticas primárias e fibroblastos renais (HODGES et al., 2008). Em um estudo de fibrose hepática em ratos, a administração subcutânea de Cygb recombinante inibiu o desenvolvimento de fibrose e aumentou a expressão de proteínas hepáticas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo (LI et al., 2016). Além disso, a ativação das vias de estresse oxidativo em camundongos sem expressão funcional do gene Cygb (camundongos Cygb<sup>-/-</sup>) foi acompanhada pelo desenvolvimento de tumor em um modelo de câncer hepatocelular (THUY et al., 2015).

Em estudo utilizando um modelo de doença hepática, o tratamento com Cygb recombinante humana inibiu significativamente nas células de Kupffer, proliferação e expressão de TNF $\alpha$  nas células estimuladas por LPS. A Cygb também inibiu a atividade da NADPH oxidase induzida por LPS e a geração de espécies reativas de oxigênio, NO e O<sub>2</sub> (WEN et al., 2017) indicando que a Cygb poderia exercer efeitos protetores contra o estresse oxidativo induzido por LPS. Além disso, camundongos nocaute para Cygb exibiram inflamação aumentada (VAN THUY et al., 2017), bem como aumento da expressão de mRNA do TNF $\alpha$  e de muitos genes associados à inflamação (YASSIN et al., 2018). Em conjunto, esses achados sugerem que a Cygb possui um papel protetor na inflamação, podendo atuar como um possível antiinflamatório e também antipirético endógeno.

Estudos de neuroproteômica realizados em nosso laboratório demonstraram que durante a febre induzida por LPS ou PGE<sub>2</sub>, considerado o mediador final da febre, ocorre aumento na abundância hipotalâmica de algumas proteínas, entre elas a

Cygb (FIRMINO et al., 2018). Desta forma, verificamos a necessidade de estudar o papel dessa proteína durante a febre e neuroinflamação.

## 2. JUSTIFICATIVA

A febre geralmente é vista como algo inofensivo para a saúde, por ser uma condição comum em nossas vidas, de fato, é bem aceito que um leve aumento na temperatura corporal pode ser benéfico para aprimorar a resposta imune (KLUGER, 1986).

Porém, o aumento da temperatura em níveis maiores pode causar danos à saúde como por exemplo a desnaturação de proteínas e a deficiência na síntese de DNA causando disfunção neuronal e dano aos órgãos (TANSEY et al., 2015). Além disso é relatado que a febre alta pode causar convulsões principalmente em crianças levando ao dano cerebral (BERG, 1992).

Para o controle da febre geralmente são utilizados medicamentos antitérmicos como o Paracetamol e Dipirona, ou medicamentos antiinflamatórios não esteroidais como Ibuprofeno, porém, o Paracetamol tem como principal efeito adverso a hepatotoxicidade podendo causar danos ao fígado, a comercialização da dipirona é proibida em alguns países devido ao risco de causar agranulocitose (KAUFMAN et al., 2006) e o Ibuprofeno pode causar danos a mucosa gástrica dentre outros efeitos adversos (SILVA, 2002), sendo assim restam poucas opções para o controle da febre dependendo da condição clínica do paciente. Diante disso, observamos a necessidade de buscar novos alvos terapêuticos para o controle tanto da febre quanto da inflamação.

Com isso, e visto que em estudos anteriores a Cygb hipotalâmica estava aumentada durante a febre induzida por LPS (FIRMINO et al., 2018), verificamos a necessidade de estudar o papel dessa proteína durante a febre. Ademais, existem anticorpos específicos para validação por western blot, a Cygb pode ser adquirida comercialmente e não há até o momento, em nosso conhecimento, estudos que correlacionam essa proteína diretamente com os mecanismos de controle da febre e neuroinflamação.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Investigar o envolvimento da citoglobina no desenvolvimento e controle da febre e da neuroinflamação.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Validar o aumento da abundância de Cygb no hipotálamo após uma dose pirogênica de LPS;
- Investigar o papel funcional da Cygb na neuroinflamação, examinando a concentração de citocinas inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL-6) em cultura de células hipotalâmicas estimuladas por LPS e co-tratadas com Cygb recombinante de rato.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Nos estudos farmacológicos de indução da febre, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da variedade Wistar. Os animais ficaram em um ambiente com temperatura de  $24 \pm 1$  °C, sob um ciclo claro-escuro de 12 h, com água e alimentos fornecidos *ad libitum*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (Protocolo 60/2018). Para a preparação de culturas primárias de APOHA, foram utilizados filhotes de ratos Wistar, obtidos de uma colônia de reprodução interna, com animais matrizes provenientes do Charles River WIGA (Sulzfeld, Alemanha). Cuidados com animais, procriação e procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética em Hessian (aprovação número GI 468\_M e GI 487\_M).

### 4.2 CIRURGIA PARA IMPLANTE DE TRANSMISSORES NA CAVIDADE PERITONEAL

Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina e cetamina e foram realizadas incisões na pele e no músculo peritoneal dos animais para a implantação dos transmissores de temperatura (Data Loggers Subcue, Calgary Canadá) e, por fim, o músculo e a pele foram suturados. Após a realização da cirurgia peritoneal, os animais receberam injeção intramuscular de terramicina para uso veterinário, como antibiótico e a flunexina, como analgésico. Posteriormente, os animais foram colocados nas caixas para aguardar o período de recuperação de sete dias para a realização dos experimentos farmacológicos.

### 4.3 INDUÇÃO DA FEBRE

Para induzir a febre, os ratos receberam uma injeção intravenosa (IV) de LPS (5 µg/kg). Os animais foram eutanasiados por decapitação 2,5 h ou 5 h após a injeção de LPS, e os hipotálamos foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido, e armazenados a 80 °C até serem processados.

### 4.4 ANÁLISE POR WESTERN BLOT

Os Western blots para Cygb foram realizados utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Foram utilizados 30 µg de proteína por poço. Logo após o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose a 100 V por 1 h. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com solução de bloqueio por 2 h e em seguida incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários, diluídos na solução de bloqueio. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase, *anti-rabbit* IgG. A imunoreatividade foi detectada pela emissão de luz por quimioluminescência. A análise quantitativa foi realizada usando o *Image J National Institute of Health*. Os dados foram normalizados para o sinal de β-actina.

### 4.5 CULTURAS DE CÉLULAS PRIMÁRIAS DA APOHA

Os experimentos in vitro foram realizados na Alemanha. As culturas primárias de células da APOHA de ratos foram preparadas como descrito por Soares et al (2013). As culturas receberam LPS (10 µg/mL) como estímulo e co-tratamento com Cygb recombinante de rato (10 e 20 µg/mL). Sendo que, a dose de LPS já havia sido padronizada em nosso laboratório, e as doses de Cygb foram testadas de acordo com estudos similares (OU et al., 2018; WEN et al., 2017). PBS foi usado como controle negativo. Após o período de incubação por 4 h, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -45 °C para posterior mensuração da concentração de citocinas.

#### 4.6 MEDIDAS DO TNF $\alpha$ E DA IL-6 E VIABILIDADE CELULAR

As citocinas foram medidas utilizando sobrenadantes de culturas de células primárias da APOHA. Os níveis de TNF $\alpha$  e IL-6 foram determinados por meio de bioensaios com base no efeito citotóxico do TNF $\alpha$  na linha celular de fibrossarcoma de ratos WEHI 164 subclone 13 e na estimulação do crescimento dependente da dose de IL-6 na linhagem celular de hibridoma B9 como relatado anteriormente (SOARES et al., 2013; OTT et al., 2010; SIMM et al., 2016). A viabilidade de células da APOHA primárias após tratamento com LPS e Cygb foi realizada utilizando o ensaio de exclusão azul de tripano como descrito por Perry et al (1997).

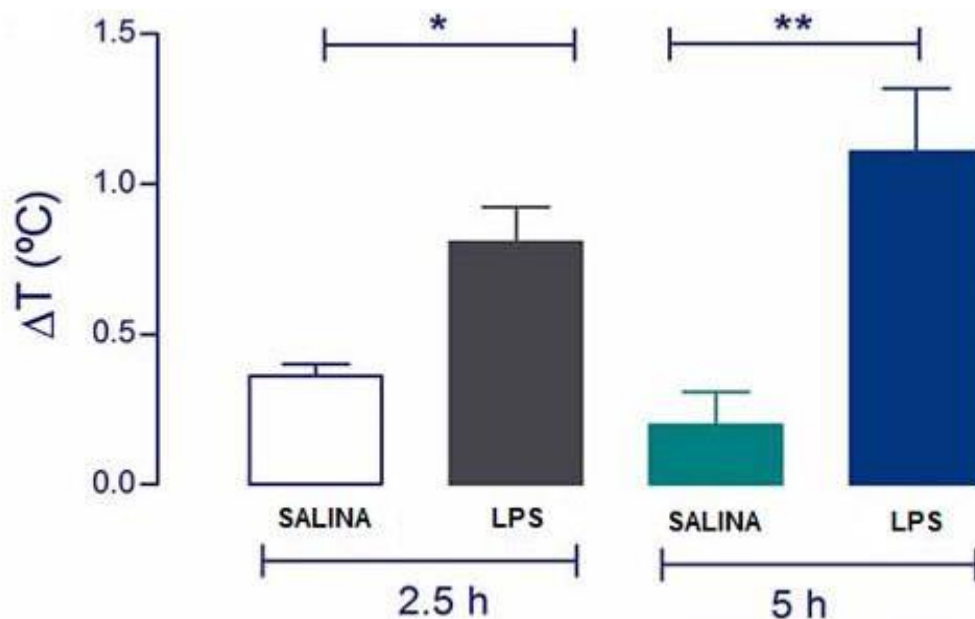
#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. As análises estatísticas foram feitas usando ANOVA, e o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas no valor de  $p < 0,05$ . A reprodutibilidade dos experimentos in vivo foi confirmada por pelo menos três experimentos independentes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 AUMENTO DA ABUNDÂNCIA DE CYGB APÓS O ESTIMULO COM LPS

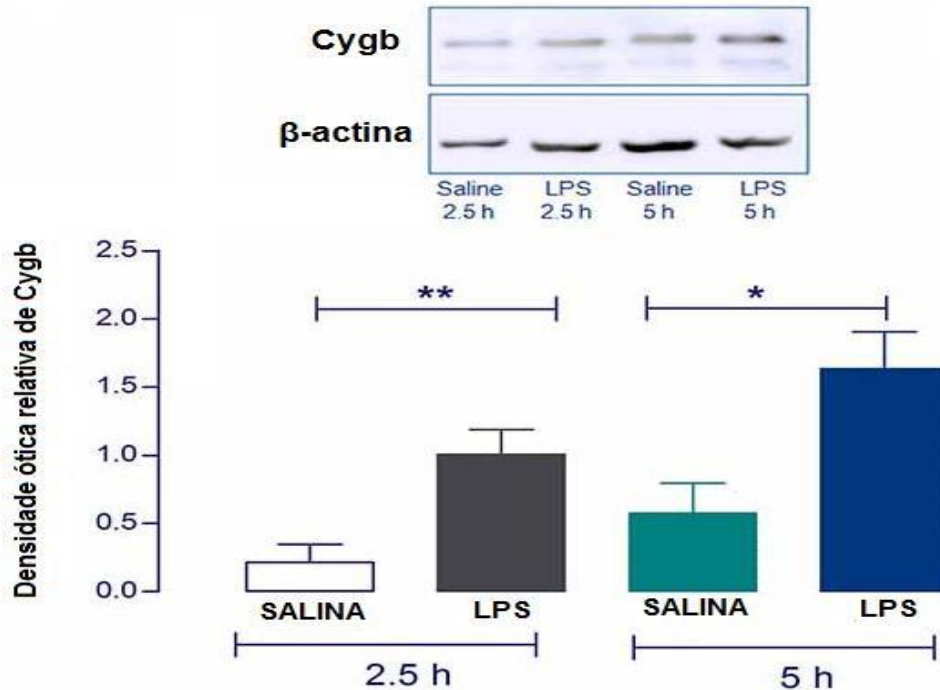
Inicialmente injetamos nos ratos uma dose pirogênica (5 µg/kg) de LPS IV ou salina a 0,9% (2 mL/Kg). As doses foram padronizadas anteriormente pelo grupo de pesquisa. Como esperado, o LPS induziu aumento significativo na temperatura corporal comparado com a salina, tanto em 2,5 h quanto em 5 h, porém esse aumento foi mais acentuado em 5 h. (Figura 3).



**Figura 3-Varição da temperatura dos ratos após a injeção IV de LPS.** O gráfico mostra a variação da temperatura média dos animais nos tempos selecionados para a coleta do hipotálamo (2,5 h ou 5 h) após a administração IV de LPS (5 µg/kg). Valores representam média ± EPM da diferença da temperatura corporal dos animais aferida após a injeção de LPS ou salina em relação a sua temperatura basal (em °C), de 4 animais por grupo. \* p<0,05, \*\*p<0,01.

Posteriormente, padronizamos a técnica de western blotting e verificamos se a Cygb estava aumentada no hipotálamo desses animais. Para isso, os hipotálamos dos animais foram coletados 2,5 h e 5 h após a injeção de LPS ou salina. Consistente com nossos resultados de análise proteômica realizados anteriormente (FIRMINO et al.,

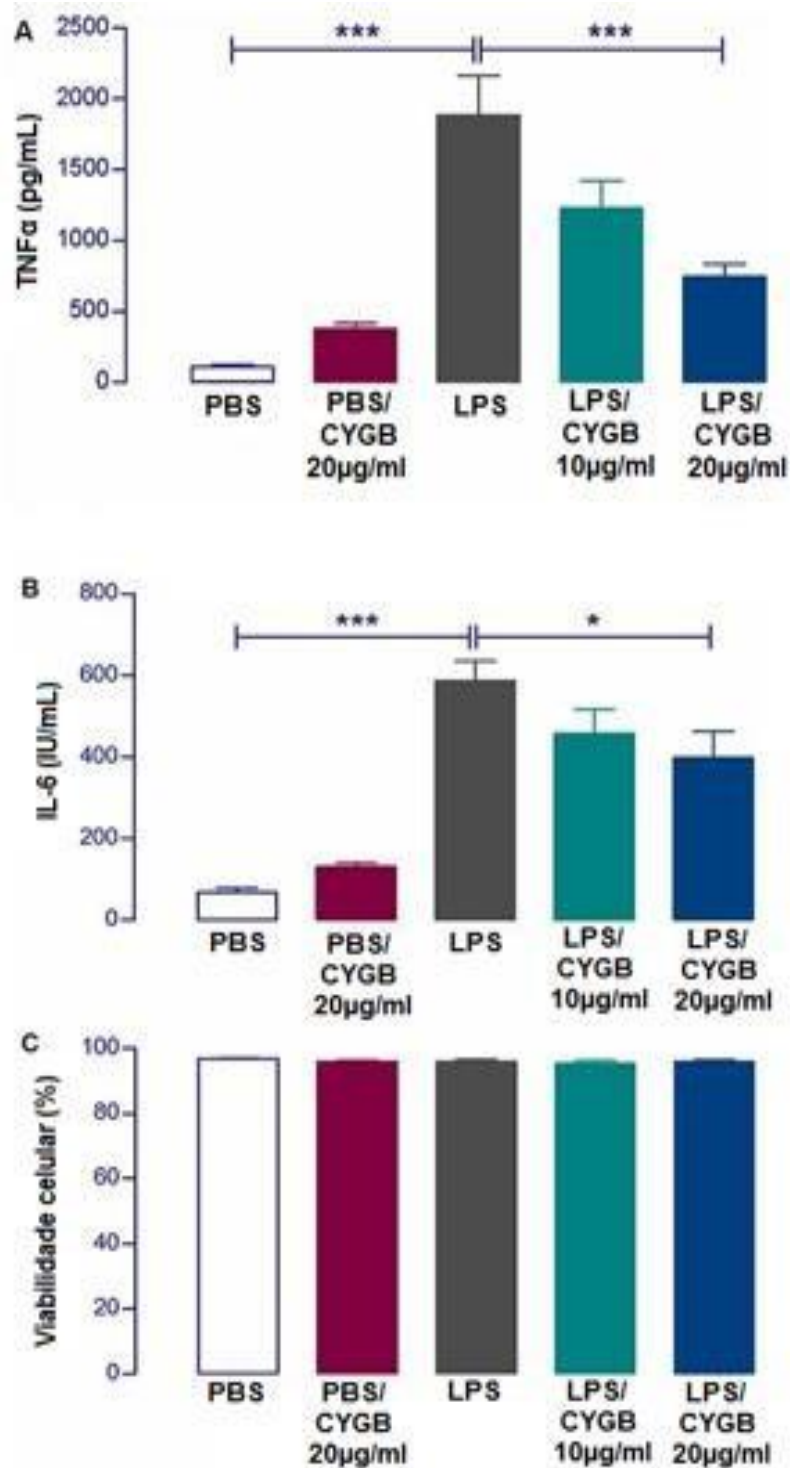
2018), validamos um aumento significativo na abundância de Cygb nos animais desafiados com LPS, em 2,5 h e 5 h.  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno (Figura 4).



**Figura 4-Aumento da abundância de Cygb nos hipotálamos de ratos desafiados com LPS.** A abundância da Cygb no hipotálamo de ratos 2,5 h e 5 h após a administração de LPS foi analisada por Western blotting. A  $\beta$ -actina foi usada como controle interno. As barras representam média  $\pm$  EPM de 4 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## 5.2 CYGB ATENUA A SECREÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDAS POR LPS

Com o objetivo de verificar o papel funcional da Cygb em condições inflamatórias, foram utilizadas culturas de células primárias da APOHA. As células foram estimuladas com LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou PBS e co-tratadas com Cygb (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 4 h. Após esse período o sobrenadante foi coletado para a análise de citocinas. Conforme esperado, a secreção de IL-6 e TNF $\alpha$  foi significativamente aumentada após a estimulação com LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em comparação ao controle. O tratamento com Cygb (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reduziu significativamente as concentrações de ambas as citocinas (Figura 5A e 5B). Essa redução na secreção de citocinas não é decorrente de morte celular, visto que não houve alteração na viabilidade celular em nenhum grupo testado (Figura 5C).



**Figura 5-Cygb atenua a secreção de IL-6 e TNF $\alpha$  induzidas por LPS.** A secreção das citocinas pro-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL-6 foi avaliada em culturas de células primárias da APOHA cultivadas em lamínulas de vidro revestidas com poli-L-lisina e incubadas por 4 h com meio fresco contendo PBS (controle negativo) ou LPS na concentração de 10  $\mu$ g/mL e co-tratadas com Cygb(10 e 20  $\mu$ g/mL). A viabilidade das células não foi alterada em nenhum grupo testado. Colunas representam média  $\pm$  EPM

de 3-4 amostras de 3-6 experimentos independentes). (diferença significativa versus grupo controle LPS; \*  $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo, além de validar dados proteômicos do nosso grupo, em que a abundância da Cygb estava aumentada no hipotálamo de animais febris desafiados com LPS ou PGE<sub>2</sub> (FIRMINO et al., 2018), demonstramos que há diminuição na concentração de TNF $\alpha$  e IL-6 em sobrenadantes de culturas primárias da APOHA após o tratamento com Cygb, revelando que essa proteína pode regular a neuroinflamação induzida por LPS.

A febre é uma condição clínica comum presente em diversas doenças, pode benéfica em alguns casos e maléfica em outros (KLUGER, 1986; BLATTEIS, 1986). Os efeitos prejudiciais da febre incluem o desenvolvimento de isquemia nos tecidos, hipóxia e o dano tecidual (HASDAY; FAIRCHILD; SHANHOLTZ, 2000). Assim novos alvos terapêuticos são importantes para o controle da febre pois, além de existirem poucos antitérmicos no mercado, existem relatos de indivíduos intolerantes a alguns antitérmicos (NIESSEN et al., 2015; CAMPOVERDE et al., 2016).

Um modelo amplamente utilizado para induzir febre é a administração do LPS, constituinte da parede de bactérias gram negativas (MICHIE et al., 1988; REIS et al., 2011). O LPS se liga ao receptor TLR4 desencadeando uma reação que provoca a liberação de várias citocinas inflamatórias (BONE, 1991) e PGE<sub>2</sub>, o que leva ao aumento de temperatura corporal denominado febre. Nosso trabalho mostrou que ao administrar o LPS (5  $\mu$ g/kg) em ratos, ocorre o aumento na temperatura corporal, em concordância com a literatura (ZEISBERGER, 1999), os tempos testados 2,5 h e 5 h também são compatíveis com os picos característicos da febre induzida por LPS (ROMANOVSKY et al., 1998).

Desde a sua descoberta em uma análise proteômica em células estreladas hepáticas de ratos há cerca de 20 anos, (KAWADA et al., 2001) a Cygb vem sendo amplamente estudada. Essa proteína é classificada como uma globina assim como a mb, neuroglobina, androglobina e hemoglobina (AMDAHL. et al., 2017). Já foi descrito que a Cygb consegue armazenar O<sub>2</sub> e pode ser capaz de produzir ou eliminar NO através do nitrito (VINOGRADOV e MOENS, 2008; TEJERO e GLADWIN, 2014). Estudos mostraram que a Cygb pode ser eficientemente reduzida por ascorbato, citocromo b<sub>5</sub>, CYPOR e NCB50R (GARDNER et al., 2010). Esses redutores podem



ser combinados com Cygb para regenerar a forma reduzida da proteína, catalisando a reação de dioxigenação do NO no estado estacionário (TEJERO e GLADWIN, 2014).

Além disso, de acordo com um estudo que provou sua localização anatômica, a Cygb é expressa na APOHA (HUNDAHL et al., 2010), revelando que esta proteína pode ter um papel importante no controle da febre.

Utilizando a técnica de western blotting observamos que a Cygb está aumentada no hipotálamo de ratos que receberam injeção IV de LPS, tanto em 2,5 h quanto em 5 h. Esses resultados validam dados proteômicos em que essa proteína estava regulada positivamente na febre (FIRMINO et al., 2018).

Sabendo que essa proteína está aumentada durante o processo febril, investigamos se ela teria um possível efeito no controle da inflamação. Para isso utilizamos cultura de células primárias da APOHA com o objetivo de observar se a Cygb conseguiria reduzir a secreção de citocinas inflamatórias como TNF $\alpha$  e IL-6.

Cygb tem sido associada com a inflamação em diversos trabalhos. Essa proteína demonstrou diminuir os níveis de NO e espécies reativas de oxigênio em células esponjosas atuando como uma enzima NO dioxigenase e eliminadora de ERO (OU et al., 2018). Evidências recentes sugerem uma interação complexa entre estresse nitro-oxidativo e inflamação (VARGA et al., 2015 ; MILATOVIC et al., 2017). Um estudo demonstrou que o aumento da inflamação do cólon promoveu um maior desenvolvimento do tumor macroscópico em camundongos deficientes em Cygb comparado ao grupo controle (YASSIN et al., 2018). Outro estudo demonstrou que o efeito hepatoprotetor de dois fármacos, diosmina e pentoxifilina foi mediado pela regulação positiva da Cygb levando a inibição da reação fibrótica (ALI et al., 2018). Além disso, camundongos deficientes em Cygb exibiram aumento na inflamação do fígado, fibrose e desenvolvimento de câncer em um modelo de esteato- hepatite não alcoólica induzida por dieta devido a ativação da via do estresse oxidativo (THUY et al., 2015).

O ponto chave da inflamação parece ser a geração de espécies reativas de oxigênio promovida por células do sistema imunológico (células dendríticas, macrófagos ou linfócitos), interleucinas e outras citocinas inflamatórias, como TNF $\alpha$  (GILMONT et al., 1996; MITTAL et al., 2014). Nossos resultados demonstraram que a Cygb reduz a secreção de IL-6 e TNF $\alpha$  em sobrenadantes de culturas primárias de

células da APOHA, revelando que essa proteína pode regular a neuroinflamação. Usando um modelo de colite em camundongos, YASSIN et al (2018) observaram que camundongos deficientes em *Cygb* desenvolveram inflamação mais severa, e que o TNF $\alpha$  aumenta a expressão de RNA mensageiro de *Cygb* em células epiteliais do cólon, condizente com nossos resultados, suportam o papel de *Cygb* como proteína citoprotetora durante a inflamação.

Também foi demonstrado que ratos deficientes de *Cygb* apresentam um fenótipo pré-ativado com aumento do estresse oxidativo e forte expressão de citocinas e quimiocinas, como IL-6 e TNF $\alpha$  em células estreladas hepáticas (MATSUMOTO et al., 2015).

Com isso, sugerimos a *Cygb* como um possível alvo terapêutico na febre e neuroinflamação, porém mais estudos precisam ser realizados para entender melhor o papel dessa proteína. Em estudos futuros pretendemos investigar o efeito da *Cygb* sobre a produção hipotalâmica de PGE<sub>2</sub> e óxido nítrico.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo validam que há um aumento da abundância de Cygb no hipotálamo de ratos após a injeção de LPS, demonstrando que essa proteína pode estar envolvida de alguma forma com a resposta febril. Para investigar melhor o seu papel funcional, utilizamos o modelo *in vitro* de culturas primárias de células APOHA e foi observado que o tratamento com Cygb atenua a secreção de IL-6 e TNF $\alpha$ , sugerindo a Cygb como uma proteína anti-inflamatória. Em estudos futuros, seria interessante verificar a interação entre a ação antioxidante e anti-inflamatória de Cygb para ampliar a investigação sobre seu potencial como alvo terapêutico para o controle da neuroinflamação e da febre.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIOS, S. et al. Analyses of expression of cytoglobin by immunohistochemical studies in human tissues. **Hemoglobin**, v. 32, p. 287–296, 2008.

ALI, Fares EM 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, 2018.

AMDAHL, Matthew B. et al. Cytoglobin at the crossroads of vascular remodeling. 2017.

BAUD, Véronique; KARIN, Michael. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends in cell biology**, v. 11, n. 9, p. 372-377, 2001.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BASTTASTINI, A. M. O. Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 17, n. 7/9, p. 58-60, 2005.

BERG, Anne T. et al. Classification of complex features of febrile seizures: interrater agreement. **Epilepsia**, v. 33, n. 4, p. 661-666, 1992.

BLATTEIS, Clark M. Fever: is it beneficial?. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 59, n. 2, p. 107, 1986.

BLATTEIS, C. M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111(1), p. 194–223, 2006.

BONE, Roger C. A patogênese da sepse. **Anais da medicina interna**, v. 115, n. 6, p. 457-469, 1991.

BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31 Suppl 5, n. Supplement 5, p. S157-61, 2000.

BRZOSKA, A. T. et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, anti-inflammatory and protective effect in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. **Endocr Rev**, v. 29, n. 5, p. 581-602, 2008.

BURMESTER, T., and HANKEL, T. Function and evolution of vertebrate globins. **Acta Physiol. (Oxf.)** v. 211, p. 501–514, 2014.

BURMESTER T., B. WEICH, S. REINHARDT, T. HANKELN. A vertebrate globin expressed in the brain. **Nature**. v. 407 p, 520 -523, 2000.

- BUTLER, A. A. The melanocortin system and energy balance. **Peptides**, v. 27, n. 2, p. 281-290, 2006.
- CAMPOVERDE, KC. et al Hypersensitivity reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Anales de Pediatria**, v. 84, p. 148-153, 2016.
- CARTMELL, T. et al. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. **J Physiol**, v. 526, p. 653-661, 2000.
- CATANIA, A. et al. Alpha melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. **Trend Endocrinol Metab**, v. 11, n. 8, p. 304-308, 2000.
- CHAKRABORTY, S.; JOHN, R.; NAG, A. Cytoglobin in tumor hypoxia: novel insights into cancer suppression. **Tumour Biol**, v. 35, p. 6207–6219, 2014.
- COCEANI, F. Et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor in cerebrospinal fluid: changes during pyrogen fever. **Brain Res** v. 612, p. 165-171, 1993.
- CONTI, B. Cytokines and fever. **Frontiers in Bioscience**, v. 9(1-3), n. 1433, 2004.
- COOPER, K.E. et al. Evidence supporting a role for endogenous vasopressin in natural suppression of fever in the sheep. **J. Physiol.**, v. 295, p. 3345, 1979a.
- COOPER, K.E. et al. Ontogeny of fever. **Fed. Proc.**, v. 38, p. 35-38, 1979b.
- DAMIANI, D. et al. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício. **Pediatria, São Paulo**, v. 1, p. 71-82, 2001.
- DINARELLO, C. A.; BUNN, P. A. Fever, Semin. **Oncol**, v. 24, p. 288-298. 1997.
- DINARELLO, Charles A. Cytokines as endogenous pyrogens. **The Journal of infectious diseases**, v. 179, n. Supplement\_2, p. S294-S304, 1999.
- 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(6), p. 335–349, 2015.
- FANG, J.; MA, I.; ALLALUNIS-TURNER, J. Knockdown of cytoglobin expression sensitizes human glioma cells to radiation and oxidative stress. **Radiat Res**, v. 176, p. 198–207, 2011.
- FEDERICO, P.; VEALE, W.L.; PITTMAN, Q.J. Vasopressin-induced antipyresis in the amygdaloid nucleus of conscious rats. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. R901-R908, 1992.
- FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W. Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**, v. 170(6), p. 2081–95, 1989.

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

GABBA, Matteo et al. CO rebinding kinetics and molecular dynamics simulations highlight dynamic regulation of internal cavities in human cytoglobin. **PloS one**, v. 8, n. 1, 2013.

GARDNER, Anne M.; COOK, Matthew R.; GARDNER, Paul R. Nitric-oxide dioxygenase function of human cytoglobin with cellular reductants and in rat hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 31, p. 23850-23857, 2010.

GILMONT, Robert R. et al. TNF $\alpha$  potentiates oxidant and reperfusion-induced endothelial cell injury. **Journal of Surgical Research**, v. 61, n. 1, p. 175-182, 1996.

GOODMAN L, GILMAN AG. As bases farmacológicas da terapêutica. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 2003.

GRADIZ, R.; PINTO, A. M. Fundamentos e Aplicações. In Fisiopatologia. **Lidel, Edições Técnicas**, p.233–242, 2013.

GROSS O, et al. Inflammasome activators induce interleukin-1 $\alpha$  secretion via distinct 464 pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. 465 Epalinges, Switzerland. **Immunity**, 2012.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 9.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1014p. 1997.

HASDAY, Jeffrey D.; FAIRCHILD, Karen D.; SHANHOLTZ, Carl. The role of fever in the infected host. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1891-1904, 2000.

HELLER, H. C.; CRAWSHAW, L. I.; HAMMEL, H. T. The thermostat of vertebrate animals. **Sci. Am**, v. 239, p. 102–110, p. 112–113, 1978.

HODGES, N. J. et al. Cellular protection from oxidative DNA damage by over-expression of the novel globin cytoglobin in vitro. **Mutagenesis**, v. 23, p. 293–8, 2008.

HUBER, M. et al. Drug-induced agranulocytosis in the Berlin case-control surveillance study. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 70, p. 339-45, 2014.

HUISING, M. O. et al. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. Wageningen, **Holanda. Dev. Comp. Immunol**, 2004.

HUNDAHL, Christian Ansgar et al. Anatomical characterization of cytoglobin and neuroglobin mRNA and protein expression in the mouse brain. **Brain research**, v. 1331, p. 58-73, 2010.

KAUFMAN, David W. et al. Relative incidence of agranulocytosis and aplastic anemia. **American journal of hematology**, v. 81, n. 1, p. 65-67, 2006.

KAWADA, N. et al. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. **J Biol Chem**, v. 276, p. 25318–25323, 2001.

KAWASAKI, H. et al. Analysis of endotoxin fever in rabbits by using a monoclonal antibody to tumor necrosis factor (cachectin). **Infect Immun**, v. 57, p. 3131-3135, 1989.

KLUGER, Matthew J.; VAUGHN, Linda K. Fever and survival in rabbits infected with *Pasteurella multocida*. **The Journal of physiology**, v. 282, n. 1, p. 243-251, 1978.

KLUGER, MATTHEW J. Is fever beneficial?. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 59, n. 2, p. 89, 1986.

KOZAK, W. et al. Molecular Mechanisms of Fever and Endogenous Antipyresis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917(1), p. 121–134, 2006.

LAWRIE, R.A. and LEDWARD, D.A. *Lawrie's Meat Science*. 6th Edition, Woodhead, Cambridge, p. 11-30, 2006.

LEON, L.R. et al. An antipyretic role of interleukin-10 in LPS fever in mice. **Am. J. Physiol**, v. 276, p. R81–R89, 1999.

LI D. et al. Cytochrome c up-regulated by hydrogen peroxide plays a protective role in oxidative stress. **Neurochem Res**, v. 32, p. 1375– 1380, 2007.

LI, Z, et al. The effect of rhCygb on CCl4-Induced hepatic fibrogenesis in rat. **Sci Rep-UK**, v. 6, n. 23508, 2016.

LOPPNOW, Harald; LIBBY, Peter. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. **The Journal of clinical investigation**, v. 85, n. 3, p. 731-738, 1990.

MARCH, C. J. et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. Seattle, Washington, USA. **Nature**, 1985.

MARTINON, Fabio; BURNS, Kimberly; TSCHOPP, Jürg. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . **Molecular cell**, v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002.

MATSUMOTO, Yoshinari et al. Cytochrome c 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, 2015.

MICHIE, H. R. et al. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. **Surgery**, v. 104, n. 2, p. 280-6. 1988.

MILATOVIC, Dejan et al. Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity. In: **Reproductive and Developmental Toxicology**. Academic Press, 2017. p. 1051-1061.

- MILLER, A. J. et al. Cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. **Am J Physiol**, v. 272, p. R857-861, 1997.
- MITTAL, Manish et al. Espécies reativas de oxigênio na inflamação e lesão tecidual. **Antioxidantes e sinalização redox**, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, 2014.
- MONTJOY, K. G. et al. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. **Science**, v.257, n.5074, p. 1248-1251, 1992.
- MORRISON, S. F. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. **Autonomic Neuroscience**, v. 196, p. 14–24, 2016.
- MORRISON, S.F.; NAKAMURA K. N. Central Mechanisms for Thermoregulation, **Ann. Rev. Physiol. in press**, 2019.
- MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K. N. Central neural pathways for thermoregulation, **Front Biosci Landmark**, v. 16, p. 74-104., 2011.
- MURPHY, M. T.; LIPTON, J. M. Peripheral administration of  $\alpha$ -MSH reduces fever in older and younger rabbits. **Peptides**, v. 3(5), p. 775–779, 1982.
- NEEB, L. et al. IL-1 $\beta$  stimulates COX-2 dependent PGE2 synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglia cells. **PloS one**, v. 6(3), p. 1-10, 2011.
- NAKAMURA, HIDEO et al. Recombinant human tumor necrosis factor causes long-lasting and prostaglandin-mediated fever, with little tolerance, in rabbits. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 245, n. 1, p. 336-341, 1988.
- NIESSEN, CV. et al. Hypersensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Clin Transl Allergy**, v. 5, p. 10, 2015.
- OAKLEY, M. S. et al. Clinical and molecular aspects of malaria fever. **Trends Parasitol**, v. 27, p. 442–449, 2011.
- OTT, D. et al. Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. **Brain Res.** v. 1363, p. 93–106, 2010.
- OU, Lingling 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, 2018.
- OUYANG, Wenjun et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 71-109, 2011.
- PERRY, S. W., EPSTEIN, L. G., GELBARD, H. A. (1997). In Situ Trypan Blue Staining of Monolayer Cell Cultures for Permanent Fixation and Mounting. **Biotechniques**, v. 22, p. 1020–1024, 1997.



REIS, R. C. et al. Central substance P NK<sub>1</sub> receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1 $\beta$  and CCL3/MIP-1 $\alpha$  in rats. **Brain Res.**, v.12, p.161-169. 2011.

ROHLFING, K. et al. Convergent evolution of hemoglobin switching in jawed and jawless vertebrates. **BMC Evolutionary Biology**, 2016.

ROMANOVSKY, Andrej A. et al. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic?. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 275, n. 1, p. R332-R338, 1998.

ROTHWELL, Nancy J. Central effects of TNF $\alpha$  on thermogenesis and fever in the rat. **Bioscience reports**, v. 8, n. 4, p. 345-352, 1988.

SACHS, H., et al. Biosynthesis and release of vasopressin and neurophysin. **Recent. Prog. Horm.**, v. 25, p. 447-491, 1969.

SHEERAN, P.; HALL, G. M. Cytokines in anaesthesia. **Br J Anaesth Br J Anaesth**, v. 78, p. 201-19, 1997.

SILVA, P. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SIMM, B. et al. Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic nucleus. **Neuroscience**, v. 313, p. 23–35, 2016.

SOARES, D.M. et al. 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 $\alpha$  or IL-6 synthesis. **Brain Behav. Immun**, v. 34, p. 120–129, 2013.

SUGIMOTO, H. et al. Structural basis of human cytoglobin for ligand binding. **J. Mol. Biol.** v. 339, p. 873–885, 2004.

TAE, B. et al. Evaluation of globins expression in brain, heart, and lung in rats exposed to side stream cigarette smoke. **Environ Toxicol**, 2016.

TANSEY EA.; JOHSON, CD. Recent advances in thermoregulation. **Adv Physiol Educ**, v. v. 39, p. 139-146, 2015.

TEJERO, Jesús; GLADWIN, Mark T. The globin superfamily: functions in nitric oxide formation and decay. **Biological chemistry**, v. 395, n. 6, p. 631-639, 2014.

THUY, L. T. T. et al. Cytoglobin Deficiency Promotes Liver Cancer Development from Hepatosteatosis through Activation of the Oxidative Stress Pathway. **Am. J. Pathol**, v. 185, p. 1045–1060, 2015.

WANEBO, H. J. Tumor necrosis factors. **Semin Surgical Oncol**, v. 5, p. 402-413, 1989.

WEBER RE, VINOGRADOV SN. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. **Physiol Rev.** v, 81 p. 569–628, 2001.

WEN, J. et al. Protective effects of recombinant human cytoglobin against chronic alcohol-induced liver disease in vivo and in vitro. **Sci. Rep,** v. 7, n. 41647, 2017.

WITTENBERG JB, WITTENBERG BA. Myoglobin function reassessed. **J Exp Biol.** V. 206 p. 2011–2020, 2003.

WHO. The management of fever in young children with acute respiratory infections in developing countries. **World Health Organization.** Geneva, 1993.

VAN THUY, T. T. et al. Possible Involvement of Nitric Oxide in Enhanced Liver Injury and Fibrogenesis during Cholestasis in Cytoglobin-deficient Mice. **Sci.Rep,** v. 7, n. 41888, 2017.

VARGA, Zoltán V. et al. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease,** v. 1852, n. 2, p. 232-242, 2015.

VINOGRADOV, Serge N.; MOENS, Luc. Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage, and sensing. **Journal of Biological Chemistry,** v. 283, n. 14, p. 8773-8777, 2008.


YASSIN, M. et al. Cytoglobin affects tumorigenesis and the expression of ulcerative colitis-associated genes under chemically induced colitis in mice. **Sci. Rep,** v. 8, n. 6905, 2018.

ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **Journal of Thermal Biology,** v. 24, n. 5-6, p. 287-326, 1999.

ZIMMERMAN, J. L.; HANANIA, N. A. Hyperthermia. In: Hall JB, Schmidt GA, Wood LDH, editors. **Principles of critical care.** 3rd ed. New York, NY: McGraw-Hill Inc; p. 1678, 2005.

## 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, 3 de setembro de 2018.


## DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"ENVOLVIMENTO DA CITOGLOBINA EXPRESSA NO HIPOTÁLAMO NO DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DA FEBRE."** Protocolo n.º 60/2018, 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* (39 machos e 39 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/09/2018 a 31/08/2021.





Prof. Dr. Cássio José da Silva  
 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.



# Cytoglobin Attenuates Neuroinflammation in Lipopolysaccharide-Activated Primary Preoptic Area Cells via NF- $\kappa$ B Pathway Inhibition

Bruna R. B. Gomes<sup>1</sup>, Gabriela Luna S. de Sousa<sup>2</sup>, Daniela Ott<sup>3</sup>, Jolanta Murgott<sup>3</sup>, Marcelo V. de Sousa<sup>1</sup>, Paulo E. N. de Souza<sup>4</sup>, Joachim Roth<sup>3</sup> and Fabiane H. Veiga-Souza<sup>1,2\*</sup>

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

## 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- $\kappa$ B Pathway Inhibition. *Front. Mol. Neurosci.* 12:307. doi: 10.3389/fnmol.2019.00307

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- $\alpha$ ) 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- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ 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- $\alpha$  in LPS-stimulated POA primary cultures via inhibition of the NF- $\kappa$ 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

## 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).