

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DÉBORA DE SOUSA ALVES DE ASSIS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA DIACILGLICEROL
QUINASE SOBRE A FEBRE E NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDAS POR
LPS

BRASÍLIA
2023

DÉBORA DE SOUSA ALVES DE ASSIS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA DIACILGLICEROL
QUINASE SOBRE A FEBRE E NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDAS POR
LPS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Fabiane Hiratsuka Veiga de
Souza

BRASÍLIA

2023

DÉBORA DE SOUSA ALVES DE ASSIS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA DIACILGLICEROL
QUINASE SOBRE A FEBRE E NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDAS POR
LPS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza

BANCA EXAMINADORA

Dra. Joice Maria Da Cunha, UFPR
(Examinadora Externa à Instituição)

Dra. Djane Braz Duarte, UnB
(Examinadora Externa ao Programa)

Dra. Mani Indiana Funez, UnB
(Examinadora Externa ao Programa)

Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga, UnB
(Presidente)

BRASÍLIA
2023

Dedico este trabalho à minha mãe, Lucimar, e meu pai, Lécio (*in memoriam*); ao meu marido, Otávio Augusto; ao meu filho, Felipe, e aos meus irmãos, Gabriel, Lucas, Davi, Tiago, Paulo e Samuel.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me permitir viver essa aventura, me guiando e protegendo todos os dias.

À minha orientadora **Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza**, que me abriu portas ao mundo da pesquisa científica estando sempre ao meu lado, da iniciação científica ao mestrado, me instigando a pensar além, por ter me acolhido sempre tão bem, de maneira leve, paciente e divertida, e por toda a orientação que me deu.

Ao meu marido, **Otávio Augusto**, que esteve ao meu lado todos os dias, me apoiou, incentivou, ouviu e, nesse final, por assumir toda a rotina de casa e filho sozinho, para que eu tivesse tempo para concluir minha escrita. Me senti muito amada por tanto.

À minha família, que sempre vibrou comigo. Em especial minha mãe, **Lucimar Maria**, que participou ativamente dessa etapa da minha vida, sempre me cuidou e ajudou, de todas as formas possíveis, para que eu pudesse concluir essa etapa. Aos meus irmãos, **Gabriel, Lucas, Davi, Tiago, Paulo e Samuel**, por se alegrarem comigo, estarem presente e também por me ajudar e incentivar tanto. Ao meu pai, **Lécio José** (*in memoriam*) que sempre lutou e se orgulhou dos meus estudos, todos os dias.

Aos membros da banca avaliadora, **Mani Indiana Funez, Joice Maria da Cunha e Djane Braz Duarte**, pela disponibilidade em auxiliar e avaliar meu trabalho.

Ao grupo de febre, em especial **Natália Guimarães, Bruna Gomes e Gabriela Luna**, por tanta partilha, tantos dias na bancada, por toda a contribuição neste trabalho. Ainda, aos meus colegas, amigos, professores e técnicos do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP), por toda a colaboração, companhia, entretenimento, parceria, apoio, incentivo, ajuda e suporte.

Ao Laboratório de Ressonância Eletrônica Paramagnética, pela disponibilidade do professor **Paulo Souza** em me orientar quanto ao uso do EPR e durante as análises de ERO e HbNO. À professora **Rita de Cássia** e sua equipe pela colaboração prestada, pela prestatividade em auxiliar nas análises de PCR.

Ao **Weverton, Juliana e Jivago** por todo suporte no biotério.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, pela oportunidade.

À **CAPES, CNPq, FAPDF e UnB**, pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, muito obrigada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. TERMORREGULAÇÃO E FEBRE	13
2.1.1. Pirógenos clássicos e modelo de febre experimental	14
2.1.2. Espécies Reativas de Oxigênio	16
2.1.3. Óxido Nítrico	19
2.1.4. Via de sinalização PI3K/AKT/NFκB	21
2.2. GLICEROFOSFOLIPÍDIOS	22
2.2.1. Diacilglicerol Quinase	23
2.2.2. Inibição farmacológica da DGK	29
3. OBJETIVOS	31
3.1. GERAL	31
3.2. ESPECÍFICOS	31
4. METODOLOGIA	32
4.1. ANIMAIS	32
4.2. CIRURGIA PARA IMPLANTE DA CÂNULA ICV	32
4.3. CIRURGIA PARA IMPLANTE DE TRANSMISSORES DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONIAL	33
4.4. MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DOS RATOS	33
4.5. EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS	34
4.5.1. Experimento 1 – Padronização da dose de R59949	34
4.5.2. Experimento 2 – Coleta das amostras para análise	34
4.6. QUANTIFICAÇÃO DE PGE ₂ NO HIPOTÁLAMO	35
4.7. EXTRAÇÃO DE DNA	35
4.8. TRANSCRIÇÃO REVERSA qRT-PCR	36
4.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	36
4.10. PREPARO DE AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE HEMOGLOBINA NITROSILADA POR RPE	36
4.11. MEDIDAS DE RPE PARA QUANTIFICAÇÃO DE ERO E HBNO	37
4.12. QUANTIFICAÇÃO DE IL-6 E TNFα NO PLASMA	38
4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Efeito da administração de LPS sobre a temperatura corporal	40
5.2. Avaliação de febre e perfil de inibição do R59949 em diferentes doses	40

5.3.	R59949 na dose de 2 µg inibe o aumento de temperatura induzido pelo LPS.....	42
5.4.	O pré-tratamento com R59949 inibe a produção de PGE ₂ hipotalâmica	43
5.5.	Análise de mRNA de animais tratados com R59949	44
5.6.	O pré-tratamento com R59949 reduz os níveis circulantes de HbNO.....	46
6.	DISCUSSÃO	48
7.	CONCLUSÃO.....	56
8.	PERSPECTIVAS	57
9.	ANEXO 1.....	58
10.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenvolvimento da resposta febril induzida por LPS	16
Figura 2: Redução do oxigênio molecular e formação de ERO.....	18
Figura 3: Esquematização do processo de formação do óxido nítrico por meio da conversão de L-arginina em L-citrulina	20
Figura 4: Via de sinalização lipídica e função da DGK.....	24
Figura 5: Classificação, estrutura primária e distribuição tecidual dos subtipos de DGK	25
Figura 6: Esquema representativo da ressíntese de PI.....	28
Figura 7: Semelhança estrutural entre os inibidores de DGK e a ritanserina	30
Figura 8: Febre induzida por LPS na dose de 5 µg/kg	40
Figura 9: Efeito da administração de diferentes doses de R59949 sobre a temperatura corporal de ratos	41
Figura 10: Efeito da administração de R59949 na dose de 2 µg/2 µL sobre a temperatura corporal de ratos	42
Figura 11: A inibição da DGK regula a concentração de PGE ₂ no hipotálamo de ratos	43
Figura 12: Efeitos do tratamento com R59949 na expressão de citocinas e fatores de transcrição inflamatórios.....	45
Figura 13: A inibição da DGK inibe os níveis circulantes de HbNO	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG: endocanabinoide 2-araquidonoilglicerol

5-HT: serotonina

AA: ácido araquidônico

AF: ácido fosfatídico

AKT: proteína quinase B

AUC: área sob a curva

cAMP: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CMH: 1-hidroxi-3-metoxycarbonil-2,2,5,5- tetrametilpirrolidina

COX-2: ciclooxigenase-2

DAG: diacilglicerol

DGK: diacilglicerol quinase

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HbNO: hemoglobina nitrosilada

IL-1 β : interleucina-1 β

IL-2: interleucina-2

IL-6: interleucina-6

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IP₃: inositol trifosfato

KHB: Krebs HEPES

LPS: lipopolissacarídeo

MCP-1: proteína quimioatraente de monócitos-1

MGL: monoacilglicerol lipase

mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NF κ B: fator de transcrição nuclear kappa B

NO⁻: ânion nitroxil

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

O₂⁻: ânion superóxido

OH⁻: radicais hidroxila

ONOO⁻: peroxinitrito

PAMP: padrões moleculares associados a patógenos

PGE₂: prostaglandina E₂

PGES: PGE₂ sintases terminais

PGH₂: prostaglandina H₂

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP₃: fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

PKC: proteína quinase C

PLA₂: fosfolipase A₂

PLC: fosfolipase C

POA: área pré-óptica

POAEP3R: neurônios da POA que expressam receptores EP3

qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RPE: ressonância paramagnética eletrônica

SNC: sistema nervoso central

TAM: tecido adiposo marrom

TLR: *toll-like receptors*

TNFα: fator de necrose tumoral alfa

TRPV1: receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1

UA: unidades arbitrárias

RESUMO

ASSIS, Débora de Sousa Alves. **Avaliação dos efeitos da inibição da diacilglicerol quinase sobre a febre e neuroinflamação induzidas por LPS**. Brasília, 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2023.

A administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS) induz uma série de respostas controladas pelo encéfalo, entre elas a febre. A febre é o aumento da temperatura corporal, que ocorre como uma resposta de defesa do organismo frente a processos inflamatórios ou infecciosos. Apesar de ter natureza benéfica, febres acima de 42°C exigem alta demanda metabólica e estão associadas a danos encefálicos. Em estudo de análise proteômica quantitativa realizada por nosso grupo, verificou-se que durante a febre induzida por LPS em ratos, ocorre ativação de vias inflamatórias e metabólicas, com destaque para o aumento da abundância da proteína diacilglicerol quinase (DGK) no hipotálamo. A DGK pertence a uma família de proteínas quinases lipídicas responsáveis pela fosforilação do diacilglicerol, convertendo-o em ácido fosfatídico, o que modula o equilíbrio entre esses dois lipídios bioativos. Pouco se sabe sobre a participação da DGK na resposta febril gerada pelo LPS e são escassos os estudos *in vivo* de sua inibição farmacológica. Desta forma, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da inibição farmacológica da DGK em um modelo de febre induzida por LPS em ratos. Ratos *Wistar* receberam administração intracerebroventricular do inibidor R59949 30 minutos antes da injeção intravenosa de LPS, com monitoramento da temperatura corporal por até 5 h. A inibição da DGK atenuou o aumento da temperatura induzido pelo LPS, acompanhado pela diminuição da produção de PGE₂ hipotalâmica. A expressão dos genes AKT, NFκB, IL-6 e TNFα no hipotálamo e os níveis circulantes de IL6, TNFα e espécies reativas de oxigênio não foram alterados pelo tratamento com o inibidor de DGK. Por outro lado, verificou-se diminuição da concentração de hemoglobina nitrosilada, o que indica redução da biodisponibilidade de NO no sangue total. Esses resultados confirmam o envolvimento da DGK na febre induzida por LPS, com ação específica na modulação da produção hipotalâmica de PGE₂ e de NO periférico, sugerindo a DGK como um potencial alvo molecular para o desenvolvimento de terapias farmacológicas mais específicas e eficazes para o controle da febre.

Palavras-chave: quinases lipídicas, febre, DGK, R59949.

ABSTRACT

ASSIS, Debora de Sousa Alves. **Evaluation of the effects of diacylglycerol kinase inhibition on LPS-induced fever and neuroinflammation.** Brasilia, 2023. Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences) – Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasilia, 2023.

Systemic administration of lipopolysaccharide (LPS) induces a series of responses controlled by the brain, including fever. Fever is the increase in body temperature, which occurs as a defense response of the body against inflammatory or infectious processes. Despite having a beneficial nature, fevers above 42°C require high metabolic demand and are associated with brain damage. In a study of quantitative proteomic analysis carried out by our group, it was verified that during the fever induced by LPS in rats, there is activation of inflammatory and metabolic pathways, with emphasis on the increase in the abundance of protein diacylglycerol kinase (DGK) in the hypothalamus. DGK belongs to a family of lipid protein kinases responsible for diacylglycerol phosphorylation, converting it into phosphatidic acid, which modulates the balance between these two bioactive lipids. Little is known about the participation of DGK in the febrile response generated by LPS and in vivo studies of its pharmacological inhibition are scarce. Thus, this work aimed to investigate the effects of pharmacological inhibition of DGK in a model of fever induced by LPS in rats. Wistar rats received intracerebroventricular administration of the R59949 inhibitor 30 minutes before the intravenous injection of LPS, with monitoring of body temperature for up to 5 h. Inhibition of DGK attenuated the increase in temperature induced by LPS, accompanied by a decrease in hypothalamic PGE₂ production. The expression of the AKT, NFκB, IL-6 and TNFα genes in the hypothalamus and the circulating levels of IL6, TNFα and reactive oxygen species were not altered by treatment with the DGK inhibitor. On the other hand, there was a decrease in the concentration of nitrosylated hemoglobin, which indicates a reduction in the bioavailability of NO in whole blood. These results confirm the involvement of DGK in LPS-induced fever, with specific action in modulating the hypothalamic production of PGE₂ and peripheral NO, suggesting DGK as a potential molecular target for the development of more specific and effective pharmacological therapies for the control of fever.

Keywords: lipid kinases, fever, DGK, R59949.

1. INTRODUÇÃO

A febre é o aumento da temperatura corporal, que ocorre em resposta a processos inflamatórios ou infecciosos (ROTH; BLATTEIS, 2014; ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015). A principal região responsável pelo controle da febre e da termorregulação é a área pré-óptica (POA) do hipotálamo (MORRISON, 2016; ZHAO et al., 2017). A elevação da temperatura corporal relacionada com a febre ocorre por mecanismos multifatoriais, envolvendo a redução da perda de calor por meio de vasoconstrição periférica e diminuição da sudorese, assim como o aumento na termogênese, associada ou não a tremores (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015).

Dados obtidos por nosso grupo, por meio de análise proteômica quantitativa, demonstraram que, durante a febre induzida por lipopolissacarídeo (LPS), ocorre ativação de vias inflamatórias clássicas como a do ácido araquidônico (AA) e do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB), assim como de vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, aminoácidos e glicerofosfolipídios, com destaque para a diacilglicerol quinase (DGK) β e γ , que apresentaram aumento na abundância de 2,13 e 4,63 vezes, respectivamente (FIRMINO et al., 2018).

A DGK pertence a uma família de proteínas quinases lipídicas responsáveis pela fosforilação do diacilglicerol (DAG), convertendo-o em ácido fosfatídico (AF) (GUO et al., 2018). Desta forma, a DGK regula o equilíbrio entre dois segundos mensageiros lipídicos, o DAG e o AF (SHIRAI; SAITO, 2014). Do ponto de vista clínico, o controle das concentrações de DAG e AF pelas diferentes isoformas de DGK tem sido implicado na patogênese de várias doenças, tais como, câncer, hipertensão e diabetes (SAKANE; MIZUNO; KOMENOI, 2016).

Assim, a investigação sobre a contribuição da DGK e de seus efetores para a regulação da febre e neuroinflamação possibilitará melhor entendimento dos mecanismos envolvidos e a identificação de possíveis alvos moleculares para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas capazes de controlar a resposta febril.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TERMORREGULAÇÃO E FEBRE

O controle da temperatura corporal é um fator de grande importância para garantir a sobrevivência do organismo. A manutenção da temperatura corporal é feita por meio de mecanismos termorregulatórios que, responsáveis por equilibrar a produção de calor com a perda de calor, mantém a temperatura interna do organismo constante, com pequenas variações (CHILDS, 2018). A termorregulação é essencial para a sobrevivência de mamíferos e é realizada, parcialmente, por neurônios sensíveis à temperatura presentes no hipotálamo (ZHAO et al., 2017).

A POA é a principal região do hipotálamo responsável pela regulação da temperatura corporal, e possui neurônios termossensíveis capazes de detectar mudanças locais de temperatura por meio do fluxo sanguíneo e ativar respostas termorreguladoras específicas para manutenção de uma temperatura constante (BARTFAI; CONTI, 2010). Estudos apontam que a POA, por meio de entradas aferentes de termorreceptores na pele, vísceras e medula espinhal, detecta alterações de temperatura periférica, além de alterações locais de temperatura. Essas mudanças na temperatura ativam sinais por meio de uma via neural descendente na POA que controlam os órgãos efetores térmicos como os vasos sanguíneos, o tecido adiposo marrom (TAM) e o músculo esquelético (TAN; KNIGHT, 2018; ZHAO et al., 2017).

Os mecanismos termoefetores de defesa contra o frio visam reduzir a perda de calor por meio da vasoconstrição cutânea, piloereção, termogênese no músculo esquelético (tremores) e no tecido adiposo marrom. Já os mecanismos de defesa contra o calor incluem o comportamento termorregulador para aumentar a perda de calor, como a vasodilatação cutânea e resfriamento evaporativo (sudorese) (MORRISON, 2016). Em humanos, a temperatura corporal central é mantida em torno de 37°C, mas certas condições são capazes de alterá-la como o ciclo de sono/vigília, o ciclo menstrual, a dieta alimentar, o estresse físico e químico, além de insultos imunológicos, como as infecções e inflamações (OKA, 2018; ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015).

Uma consequência do processo de inflamação ou infecção é a febre (BLOMQUIST; ENGBLOM, 2018). A febre é uma condição fisiológica que se caracteriza por um aumento regulado da temperatura corporal acima de sua faixa

circadiana normal (ROTH; BLATTEIS, 2014), e ocorre por meio de mecanismos que tanto aumentam a produção de calor quanto diminuem a perda de calor (MEIER; LEE, 2017). Por meio de mecanismos termorreguladores, neurônios hipotalâmicos buscam manter a temperatura em um ponto de equilíbrio e durante a febre esse ponto de equilíbrio é reajustado a valores acima dos anteriormente estabelecidos. Com isso, neurônios específicos serão ativados para que se inicie a produção e conservação de calor, a fim de alcançar o novo ponto de equilíbrio (CHILDS, 2018; MEIER; LEE, 2017).

A febre é uma reação fisiológica favorável ao organismo para combater a infecção e inflamação, uma vez que a resposta imunológica se torna mais eficaz, aumentando a estimulação de processos inflamatórios e fatores de proteção celular, como migração de neutrófilos e linfócitos, fagocitose, atividade de células dendríticas e produção de anticorpos (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018). Mas em diversas situações a febre pode se tornar prejudicial ao organismo por apresentar alta demanda metabólica, aumento do consumo de oxigênio, citotoxicidade por desnaturação de proteínas e prejuízo na síntese de DNA, podendo gerar efeitos neurológicos críticos como delírio, convulsões e dano cerebral (DRUML, 2019; TANSEY; JOHNSON, 2015). Relatos indicam que em temperaturas acima de 40 °C há aumento da mortalidade em casos de infecção, o que sugere que os efeitos benéficos da febre são suprimidos pelos deletérios (WALTER et al., 2016).

2.1.1. Pirógenos clássicos e modelo de febre experimental

Pirógenos são substâncias com capacidade de induzir a febre e podem ser diferenciados em pirógenos endógenos, produzidos pelo organismo como as citocinas e eicosanoides, e pirógenos exógenos que podem ser os microrganismos e seus subprodutos, antígenos e drogas (ROTH; BLATTEIS, 2014; WALTER et al., 2016). Os pirógenos endógenos podem ser produzidos e liberados após o reconhecimento do sistema imunológico a um pirógeno exógeno (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018).

O principal pirógeno utilizado no modelo de febre experimental é o LPS, componente da membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas (RUMMEL, 2016; SOARES et al., 2017). A administração intravenosa de LPS causa

febre ou hipotermia em animais a depender da temperatura ambiente e da dose administrada (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018).

A detecção imune da infecção começa com a ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), como neste caso o LPS, a receptores de reconhecimento de patógenos, como os *toll-like receptors* (TLR), encontrados em células imunológicas circulantes ou residentes (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; HARDEN et al., 2015). A ativação dos TLR pode gerar cascatas de transdução de sinal por meio do NFκB, estimulando a síntese de citocinas, como a interleucina-1β (IL-1β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNFα), quimiocinas, moléculas de adesão, e as formas induzíveis de algumas enzimas inflamatórias, por exemplo, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (BARTFAI; CONTI, 2010; ROTH; BLATTEIS, 2014).

Após estimulação com LPS, a primeira citocina pirogênica a ser detectada na corrente sanguínea é TNFα, seguido de um sutil aumento de IL-1β e um aumento prolongado de IL-6 (ROTH; BLATTEIS, 2014). Essas citocinas são transportadas pelo sangue ao encontro de receptores específicos nas células endoteliais de regiões próximas ao hipotálamo. Com essa estimulação, ocorre a indução da enzima COX-2, enzima responsável pela oxidação do AA, presente na membrana plasmática, em prostaglandina E₂ (PGE₂), que é liberada no encéfalo e pode acessar a POA, para gerar a resposta febril (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015).

A PGE₂ atua em receptores EP3 presentes nos neurônios termorregulatórios da POA para provocar elevação da temperatura corporal, diminuindo a taxa de disparo dos neurônios sensíveis ao calor, o que resulta em aumento da temperatura corporal e consequente geração da febre. Assim, a PGE₂, ao ativar receptores EP3 na POA, é considerada o mediador final da febre (**Fig. 1**) (BLOMQVIST; ENGBLOM, 2018; WALTER et al., 2016).

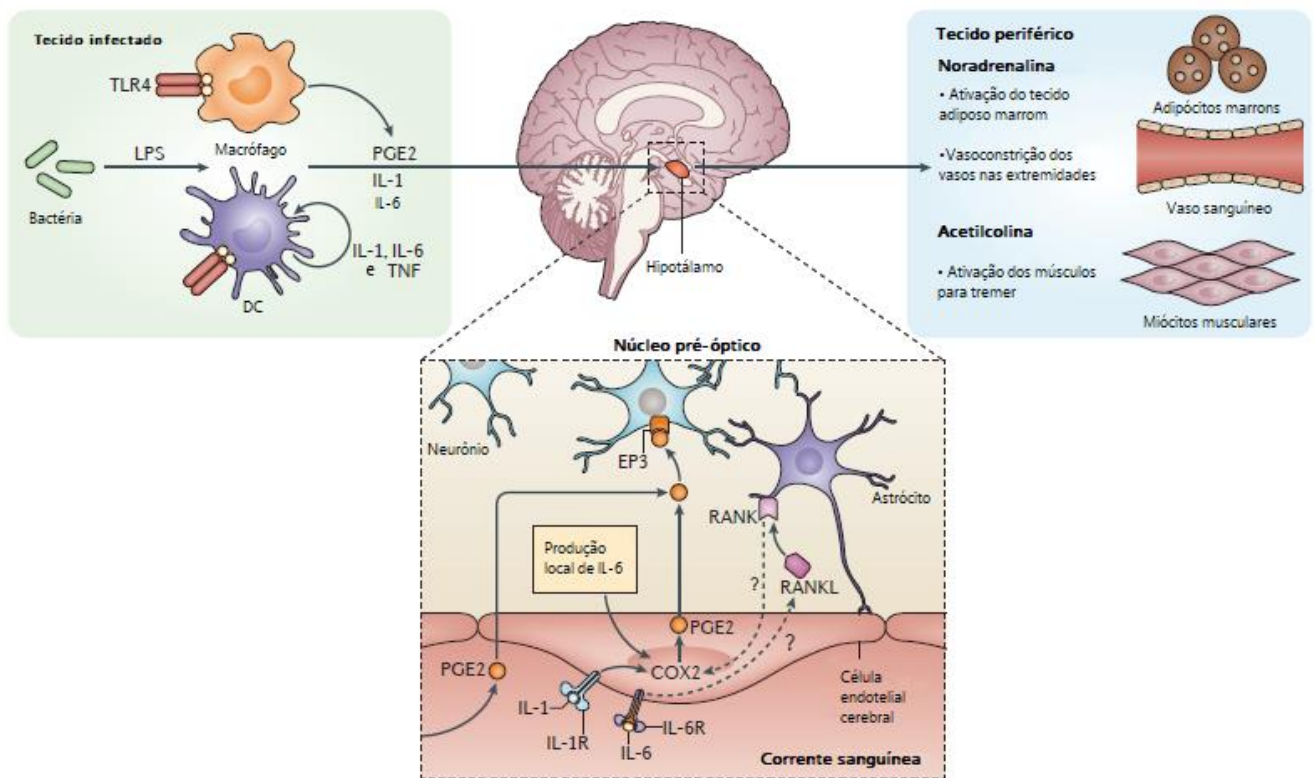


Figura 1: Desenvolvimento da resposta febril induzida por LPS. A ativação de receptores TLR nas células imunes pelo LPS geram liberação de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea capazes de aumentar a expressão de COX-2 endotelial na POA, resultando em aumento dos níveis de PGE₂. O reconhecimento da PGE₂ pelos receptores EP3 nos neurônios termorregulatórios hipotalâmicos desencadeia a febre. Adaptado de: EVANS, REPASKY e FISHER, 2015.

A PGE₂ é sintetizada a partir do AA liberado dos fosfolipídios de membrana por meio da ação da fosfolipase A₂ (PLA₂). Em seguida, o AA é oxigenado pela COX para formar prostaglandina H₂ (PGH₂), que é então convertida em PGE₂ via PGE₂ sintases terminais (PGES) (CHENG et al., 2021; ROTH; BLATTEIS, 2014). Novos estudos apontam uma via alternativa para a produção de AA, que ocorre a partir do endocanabinóide 2-araquidonoilglicerol (2-AG) que, ao ser hidrolisado pela monoacilglicerol lipase (MGL), gera AA e glicerol (KITA et al., 2015). A PGE₂ exerce seus efeitos biológicos ligando-se em quatro receptores diferentes, EP1–EP4, localizados na membrana plasmática, expressos abundantemente no sistema nervoso central (CHENG et al., 2021; SAPER; ROMANOVSKY; SCAMMELL, 2012).

O receptor EP3 é tido como o principal tipo responsável pela febre, uma vez que camundongos nocautes para EP3, diferentemente dos nocautes para EP1, EP2

e EP4, não foram capazes de desenvolver febre em resposta a administração de PGE₂, IL-1 β ou LPS (USHIKUBI et al., 1998). Os receptores EP3 são acoplados a proteínas G inibitórias, então sua transdução de sinal resulta na inibição da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, em níveis reduzidos de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) (CHENG et al., 2021; GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018; SAPER; ROMANOVSKY; SCAMMELL, 2012).

Estudo recente sugere que os neurônios da POA que expressam receptores EP3 (POAEP3R) controlam bidirecionalmente a temperatura corporal por meio de uma sinalização gabaérgica tônica (NAKAMURA et al., 2022). Estes neurônios gabaérgicos, em condições fisiológicas normais, são sensíveis ao calor e inibem neurônios próximos que conduzem as respostas de defesa contra o frio, suprimindo a termogênese do TAM e a vasoconstrição da pele (ZHAO et al., 2017). Nakamura e colaboradores verificaram que os neurônios POAEP3R são ativados em resposta à temperatura ambiente elevada, mas inibidos pela PGE₂. A estimulação quimiogénica dos neurônios POAEP3R expostos à temperatura ambiente reduziu a temperatura corporal por aumentar a dissipação de calor, enquanto a inibição deles pela PGE₂ provocou febre envolvendo a termogênese do TAM (NAKAMURA et al., 2022).

A ligação de PGE₂ nos receptores EP3 reduz a sinalização de neurônios gabaérgicos, desinibindo assim a ativação simpática da vasoconstrição da pele e termogênese do TAM, levando ao desenvolvimento da febre (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018; NAKAMURA et al., 2022; SAPER; ROMANOVSKY; SCAMMELL, 2012).

2.1.2. Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são um grupo de moléculas reativas derivadas da redução de um ou dois elétrons do oxigênio molecular (CHENG et al., 2018; KIM et al., 2015). O oxigênio é suscetível à formação de radicais devido a dois elétrons desemparelhados presentes na camada externa de elétrons (KIM et al., 2015). Por esse motivo, as ERO são moléculas instáveis e de meia vida curta, da ordem de milissegundos, que reagem rapidamente com outras moléculas a fim de emparelhar seus elétrons (DROUGARD et al., 2015). As ERO intracelulares existem

principalmente em três formas: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$) (BIGARELLA; LIANG; GHAFARI, 2014) (**Fig. 2**).



Figura 2: Redução do oxigênio molecular e formação de ERO. A redução consecutiva de oxigênio causa a formação de uma variedade de ERO, que incluem superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), íon hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O ponto vermelho indica um elétron desemparelhado. Adaptado de: KIM et al., 2015.

A produção de ERO é controlada por sistemas antioxidantes endógenos, uma vez que são essenciais em diversas vias de sinalização, participam da defesa do sistema imune contra patógenos e modulam atividades celulares como a expressão gênica, proliferação e sobrevivência celular (KIM et al., 2015). Porém, quando há um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, o excesso de ERO gera o estresse oxidativo, condição prejudicial ao organismo, já associada à diversas patologias como diabetes, câncer, inflamação, obesidade e neurodegeneração (DROUGARD et al., 2015; NAIK; DIXIT, 2011; TAFANI et al., 2016). Para neutralizar isso, a célula conta com alguns sistemas antioxidantes, o que auxilia na prevenção do acúmulo de ERO e na reparação de danos oxidativos nos componentes celulares. São eles: superóxido dismutase, catalase, peroxirredoxinas, tioredoxina, glutathione peroxidase, glutathione redutase e xantina oxidase (BIGARELLA; LIANG; GHAFARI, 2014).

Por se tratar de moléculas altamente reativas e devido aos mecanismos oxidantes do organismo, as concentrações de ERO *in vivo* são baixíssimas, da ordem de pico ou nanomolar. Dessa forma, para a quantificação de ERO em sistemas biológicos, são utilizados marcadores de spin, que reagem com as ERO formando

compostos estáveis, que emitem sinal de detecção pelo equipamento de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (DIKALOV; HARRISON, 2014).

As ERO também podem incluir compostos contendo nitrogênio ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), como óxido nítrico (NO), ânion nitroxil (NO^-) e peroxinitrito (ONOO^-) (TAFANI et al., 2016). As ERO estão envolvidas em diversos processos, como na inflamação, crescimento e sobrevivência celular, mecanismos de defesa, expressão gênica e apoptose (KIM et al., 2015). Há evidências de que as ERO podem atuar como sinalizadoras para ativar a produção de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo o processo inflamatório (KABAT; PEARCE, 2017). Diferentes estímulos podem levar à formação de ERO, como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, hipóxia e irradiação (ZHANG et al., 2016). Em contrapartida, as ERO mitocondriais influenciam a transcrição de citocinas inflamatórias como a IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ (NAIK; DIXIT, 2011). Nosso grupo demonstrou que durante a febre induzida por LPS há aumento de ERO no hipotálamo, tecido adiposo marrom e fígado de ratos, sugerindo papel inflamatório associado ao estresse oxidativo (GOMES et al., 2018).

2.1.3. Óxido Nítrico

O NO é um gás de meia vida curta, capaz de se difundir amplamente nas células, que possui um elétron desemparelhado, o que possibilita inúmeras interações com diferentes moléculas (DROUGARD et al., 2015). Sua síntese ocorre a partir do catabolismo da L-arginina através da atividade da enzima NO sintase (NOS) resultando na formação de L-citrulina e NO (**Fig. 3**) (ROTH; BLATTEIS, 2014; STEINER; BRANCO, 2001). Três isoformas de NOS foram identificadas, as isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) são constitutivamente expressas nos tecidos, enquanto a iNOS geralmente não é expressa em condições basais, mas pode ser superexpressa mediante estímulos (STEINER; BRANCO, 2001). A NOS pode ser ativada transcricionalmente por meio da via $\text{PI3K/AKT/NF}\kappa\text{B}$ e, sua forma induzida, principalmente pelo LPS e citocinas, como $\text{IFN-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e $\text{TNF-}\alpha$ (JIANG et al., 2016).

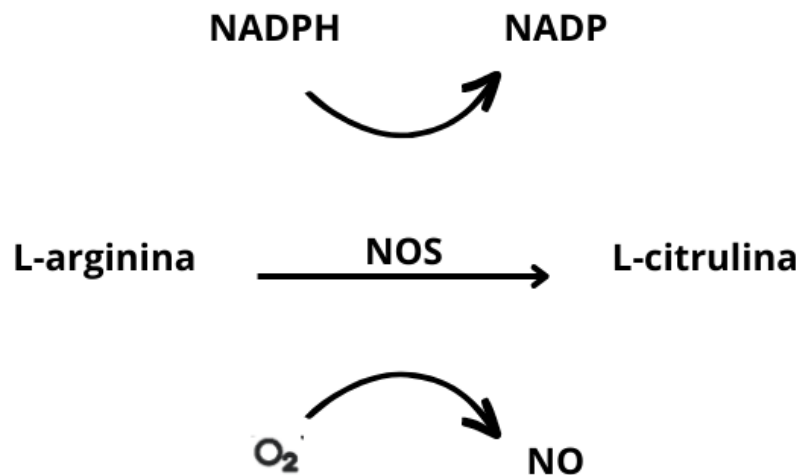


Figura 3: Esquematização do processo de formação do óxido nítrico por meio da conversão de L-arginina em L-citrulina. Fonte: própria autora.

O NO é essencial em vários processos biológicos como a vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e modulação da neurotransmissão (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014; STEINER et al., 2002). Além desses eventos, o NO também está envolvido em processos fisiopatológicos como a termorregulação, febre e neuroinflamação (LJUBISAVLJEVIC; STOJANOVIC, 2015; STEINER; BRANCO, 2001). O NO tem funções particulares na inflamação, provocando vasodilatação, adesão leucocitária e aumento na permeabilidade celular, favorecendo o processo inflamatório (LIY et al., 2021). É relatado que o NO participa da resposta febril atuando tanto em locais periféricos quanto centrais, comportando-se como um regulador da febre a depender do estímulo (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014; STEINER; BRANCO, 2001). O aumento da temperatura de forma regulada, como na febre, está associado ao aumento da disponibilidade de NO periférico, o qual está envolvido na ativação da termogênese do TAM e na dilatação da vasculatura da pele (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014).

Os principais impactos fisiopatológicos do NO ocorrem após sua reação com o ânion superóxido resultando em peroxinitrito, uma ERN altamente reativa e instável, capaz de afetar a função enzimática por oxidação ou nitração, induz dano celular por peroxidação lipídica e ataca enzimas mitocondriais levando à disfunção mitocondrial (STEVEN et al., 2017; TAFANI et al., 2016).

O NO pertence à família das ERN, mas por ser um gás derivado tanto de nitrogênio quanto de oxigênio, também pode ser associado às ERO (DROUGARD et al., 2015).

2.1.4. Via de sinalização PI3K/AKT/NFκB

A resposta inflamatória e a febre ocorrem por meio de uma ativação coordenada de várias vias de sinalização que regulam a expressão e liberação de mediadores inflamatórios (NEWTON; DIXIT, 2012). A sinalização de PI3K/AKT é uma via de sinalização importante na regulação de funções celulares essenciais. A PI3K é uma proteína ligada à membrana que, quando ativada, fosforila o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP₃). Essa conversão ativa a proteína quinase B (AKT) que, fosforilada, participa de diversos processos celulares (MIRICESCU et al., 2021). A AKT ativada medeia a regulação do crescimento celular, proliferação, ciclo celular e glicometabolismo, fosforilando muitas proteínas como Caspase-9, proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e fatores de transcrição, como o NFκB (XU et al., 2020). Há uma proteína reguladora desta via, a PTEN, uma fosfatase que desfosforila PIP₃ em PIP₂, fazendo o inverso da PI3K, resultando na não ativação de AKT (MIRICESCU et al., 2021). Na inflamação, o acúmulo de ERO contribui para a fosforilação de AKT (CAI et al., 2022), ativação de NFκB e inativação da PTEN (ZHANG et al., 2016), podendo sugerir que a presença de ERO atua de forma sinérgica com a via de sinalização PI3K/AKT/NFκB.

O NFκB, um dos fatores de transcrição ativados na via PI3K/AKT, está envolvido em alguns processos celulares, como em respostas imunes e inflamatórias, na adesão, proliferação, e diferenciação celular, além da apoptose e oncogênese (FAN; MAO; YANG, 2013; MINCHEVA-TASHEVA; SOLER, 2013). Isso ocorre porque a ativação de NFκB é realizada por diversos fatores, como infecções (LPS), citocinas inflamatórias (TNFα, IL-1β), estresses físicos, fisiológicos e oxidativos (ERO) (NAPETSCHNIG; WU, 2013; OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011). A ativação de NFκB resulta na maior produção dos principais elementos inflamatórios, como TNFα, IL-6, IL-1, IL-8, o que sugere um mecanismo de feedback positivo nesta via (FAN; MAO; YANG, 2013).

2.2. GLICEROFOSFOLIPÍDIOS

Recentemente, Firmino e colaboradores (2018) demonstraram, por meio de análise proteômica do tecido hipotalâmico, modificações nas vias inflamatórias e metabólicas associadas à resposta febril induzida por LPS ou por PGE₂. Ambos os estímulos favoreceram ativação de vias inflamatórias clássicas como a do AA e do NFκB, assim como de vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, aminoácidos e glicerofosfolipídios (FIRMINO et al., 2018).

Os fosfolipídios são formadores de membrana que participam da manutenção da homeostase por meio de regulação de diversos processos biológicos como proliferação celular, biossíntese de lipídios, resposta imune, inflamação e apoptose (BOLDYREVA et al., 2021; ZENG et al., 2017). Alterações no metabolismo lipídico são associadas a algumas doenças como diabetes, obesidade, câncer e Alzheimer (ZENG et al., 2017). Os glicerofosfolipídios são os principais fosfolipídios que integram as membranas biológicas, e estão intimamente relacionados à inflamação e febre (HISHIKAWA et al., 2014; VALENTINE et al., 2022; XIE et al., 2022). Evidências indicam que ocorre desregulação dos níveis de glicerofosfolipídios na inflamação (BOLDYREVA et al., 2021) e na febre, com consequente alteração dos níveis de AA, COX-2 e PGE₂ (XIE et al., 2022).

Os glicerofosfolipídios são regulados por enzimas metabolizadoras de lipídios, como fosfolipases e lipídio quinases (GU et al., 2019; HISHIKAWA et al., 2014). Após ação dessas enzimas há produção de mediadores lipídicos ou segundos mensageiros, como o AA, inositol trifosfato (IP₃), DAG, AF e lisofosfatídico, que conduzem a diversas vias de sinalização celular (HUANG; FRETER, 2015; IGLESIAS GONZÁLEZ et al., 2019). As vias de sinalização de citocinas inflamatórias podem induzir enzimas que regulam o metabolismo lipídico (HUANG; FRETER, 2015).

No estudo de Firmino e colaboradores (2018), durante a febre induzida por LPS, grande quantidade das proteínas envolvidas no metabolismo de glicerofosfolipídios foi regulada positivamente. Dentre as proteínas diferencialmente abundantes nesta via destacam-se a DGKβ e DGKγ, que apresentaram maior abundância durante a febre induzida por LPS (FIRMINO et al., 2018).

2.2.1. Diacilglicerol Quinase

Estímulos externos desencadeiam a hidrólise de PIP₂, um glicerofosfolipídio presente na membrana, por meio da ativação da fosfolipase C (PLC), com subsequente geração de dois segundos mensageiros, DAG e IP₃ e diminuição dos níveis de PIP₂ (BLUNSOM; COCKCROFT, 2020; GOTO; FUNAYAMA; KONDO, 1994).

A DGK é uma proteína quinase lipídica responsável pela fosforilação de DAG, convertendo-o em AF (ÁVILA-FLORES et al., 2005; BLITTERSWIJK; HOUSSA, 2000). Ou seja, a reação da DGK modula o equilíbrio entre dois lipídios bioativos, atenuando a sinalização de DAG e intensificando a sinalização de AF (AKIMOTO et al., 2020; GUO et al., 2018). Sendo a principal reguladora dos níveis de DAG e AF, a DGK se tornou um promissor alvo de estudos, já que a falta de equilíbrio entre esses dois lipídios está sendo associada a diversas doenças relacionadas a proliferação, migração e crescimento celular mediada por citocinas ou fatores de crescimento e metabolismo da glicose (FAZIO et al., 2020; MERIDA et al., 2019).

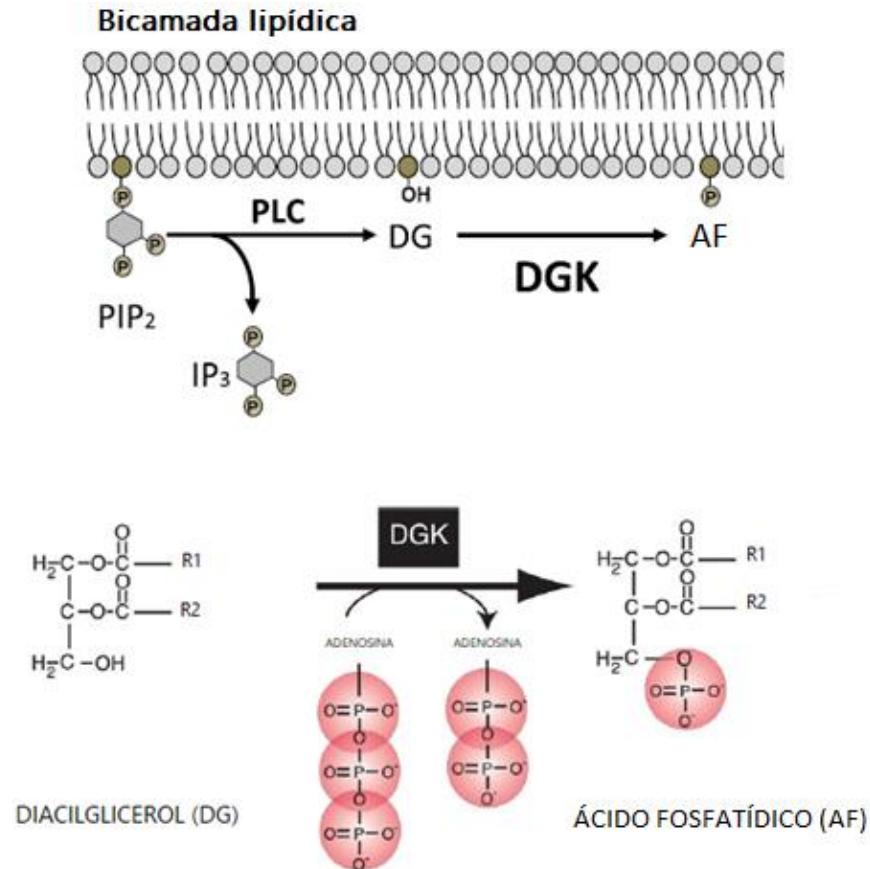
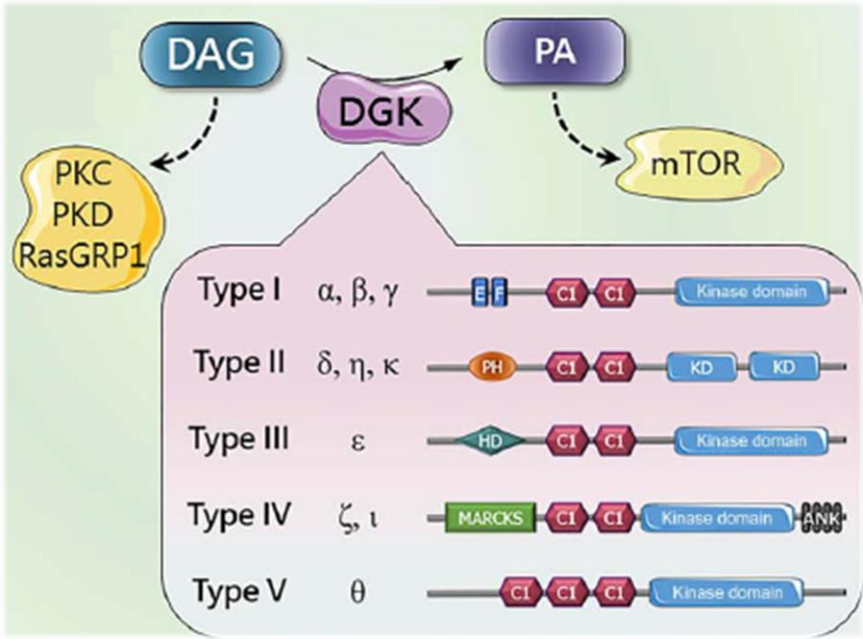


Figura 4: Via de sinalização lipídica e função da DGK. Após estímulo, PIP₂, um lipídio de membrana, por meio da PLC é hidrolisado em IP₃ e DAG. O papel da DGK determina a sinalização de DAG, uma vez que catalisa a fosforilação de DAG para produzir AF, utilizando o ATP como doador de fosfato. Adaptado de: (MÉRIDA; ÁVILA-FLORES; MERINO, 2008; NAKANO, 2015).

A DGK foi identificada na maioria dos organismos estudados, mas sua expressão em mamíferos é mais bem caracterizada (SHULGA; TOPHAM; EPAND, 2011). Em mamíferos foram identificadas e caracterizadas 10 isoformas da enzima DGK (α - κ), divididas em 5 grupos diferentes (tipos I-V) de acordo com a estrutura primária, especificidade do substrato e distribuição tecidual (MÉRIDA; ÁVILA-FLORES; MERINO, 2008; ZHU et al., 2016). Os diferentes subtipos de DGK exibem diferentes distribuições teciduais, padrões de expressão e funções biológicas (GU et al., 2019). Todas as 10 isoformas de DGK de mamífero compartilham em sua estrutura um domínio catalítico conservado e dois domínios de tipo I conservados de proteína quinase C (PKC), mas apenas as DGK tipo I têm sua atividade dependente de Ca^{2+} (**Fig. 5**) (MERIDA; GRAZIANI; SAKANE, 2017; SIM; KIM; YANG, 2020).



Isoformas DGK	Expressão Tecidual	Localização Subcelular
α	Cérebro - micróglia	Membrana Plasmática, núcleo e citoplasma
	Rins	
	Células T	
β	Cérebro - neurônios	Citoesqueleto e membrana pré-sináptica
γ	Ratos - cérebro	Complexo de Golgi e núcleo
	Humanos - retina	
δ	Músculo esquelético	Citoplasma, retículo endoplasmático, endossomos e núcleos
	Cérebro	
η	Cérebro	Citoplasma e endossomos
κ	Placenta	Membrana Plasmática
	Testículos	
ε	Cérebro	Membrana Plasmática e retículo endoplasmático
ζ	Células T	Citoplasma, membrana plasmática e núcleo
	Cérebro - neurônios	
ι	Cérebro - neurônios	Citoplasma e núcleo
θ	Cérebro - neurônios	Membrana plasmática, núcleo e vesículas pré-sinápticas

Figura 5: Classificação, estrutura primária e distribuição tecidual dos subtipos de DGK. São 10 as isoformas de DGK distribuídas em 5 tipos diferentes, com base em sua estrutura, especificidade e distribuição tecidual. PA: ácido fosfatídico. Fonte: (BARBER; RABEN, 2019; MASSART; ZIERATH, 2019)

A DGK é uma proteína altamente expressa na maioria dos tecidos, tornando possível que, em um mesmo tipo celular, se encontrem diferentes isoformas da DGK

(SHULGA; TOPHAM; EPAND, 2011). A DGK γ , juntamente com a DGK α e DGK β , compõem o tipo I e estão presentes de forma abundante no sistema nervoso central (SNC), diferindo em sua localização tecidual e celular (BLITTERSWIJK; HOUSSA, 2000).

A DGK β é menos abundante quando comparada às outras isoformas de DGK, mas com prevalência apenas no SNC, principalmente no córtex cerebral e hipocampo (SHIRAI et al., 2010; SHULGA; TOPHAM; EPAND, 2011). Está envolvida em processos de espinogênese e indução de neurites mediadas pelo aumento na produção de AF (KANO et al., 2014; NAKAI et al., 2020; SHIRAI et al., 2010). Quanto à sua localização, dados sugerem que está expressa especificamente em neurônios (NAKAI et al., 2020; SHIRAI; SAITO, 2014), entretanto, há relatos de sua presença na micróglia (UEYAMA et al., 2004).

Diferentemente da DGK β , a DGK γ está associada ao sistema imune, uma vez que sua expressão é aumentada em células endoteliais após estimulação com IL-1 β (NAKANO et al., 2012), e por regular negativamente a diferenciação de macrófagos (YAMADA et al., 2003). Pouco se sabe da sua participação no SNC, além da localização principalmente em Células de Purkinje (ADACHI et al., 2005; TSUMAGARI et al., 2020). O estudo da localização das diferentes isoformas de DGK é complexo, uma vez que condições patológicas são capazes de alterar a expressão tecidual dessa enzima (SHULGA; TOPHAM; EPAND, 2011).

Evidências indicam que a atividade exercida pelas enzimas DGK sobre a conversão de DAG em AF parece ser um alvo promissor para o tratamento de diversas doenças humanas. Tanto o DAG quanto o AF são componentes estruturais de membranas celulares, mas além desse papel estrutural, esses dois lipídeos atuam como segundos mensageiros, com ações de sinalização e comunicação celulares, tais como ativação de PKC e produção de mediadores inflamatórios (MERIDA et al., 2019). Além disso, há aumento nos níveis de DAG e AF em resposta a estímulos inflamatórios (MAHAJAN; MELLINS; FACCIO, 2020).

Como uma das ações do DAG é ativar a PKC, o controle da conversão entre DAG e AF pela DGK também regula a ativação da PKC, pois reduzindo o nível de DAG, a DGK inibe indiretamente a atividade da PKC (MÉRIDA et al., 2019). Esse dado merece destaque, uma vez que a inibição farmacológica da PKC inibe a resposta

febril, a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS e diminui a formação de ERO (KOZAK et al., 2017; UEYAMA et al., 2004). Ainda, o aumento nos níveis de DGK, além da diminuição dos níveis de PKC, apresentou efeitos anti-histamínicos em camundongos (GANESH et al., 2018).

Para investigar o papel da DGK na febre e neuroinflamação, também se faz necessário avaliar a participação do seu produto, o AF, nessas condições. Em mamíferos, AF regula a apoptose e proliferação celular, principalmente por meio da via de sinalização da mTOR (BOLDYREVA et al., 2021). Dados da literatura demonstram que, após estímulo com LPS, há aumento nas concentrações de AF, com consequente aumento na liberação de citocinas e ativação de macrófagos (MORITA; UEDA; KITAGAWA, 2009; OKADA et al., 2012). Ainda, relata-se que o AF participa da ativação da NADH oxidase, enzima envolvida na produção de ERO, por mecanismos semelhantes à ativação feita pelo AA nesta mesma enzima (BALDANZI; MALERBA, 2019; PALICZ et al., 2001). Além destas funções, o AF é um glicerofosfolipídio que age como precursor na síntese de outros fosfolipídios, como fosfatidilinositol e ácido lisofosfatídico, este envolvido na secreção de citocinas pró-inflamatórias e produção de NO e PGE₂ (BOLDYREVA et al., 2021; VALENTINE et al., 2022).

Entretanto, dados sobre o AF são conflitantes, uma vez que foi identificado que um de seus metabólitos atenua a dor neuropática e neuroinflamação induzida por LPS, por diminuir a produção de PGE₂ (SHIBAIKE et al., 2019). Ademais, a conversão do DAG em AF representa o início do ciclo de ressíntese do fosfatidilinositol, em que PIP₂ é reabastecido e toda a sinalização de DAG reiniciada (**Fig. 6**) (FAZIO et al., 2020; SAKANE et al., 2021).

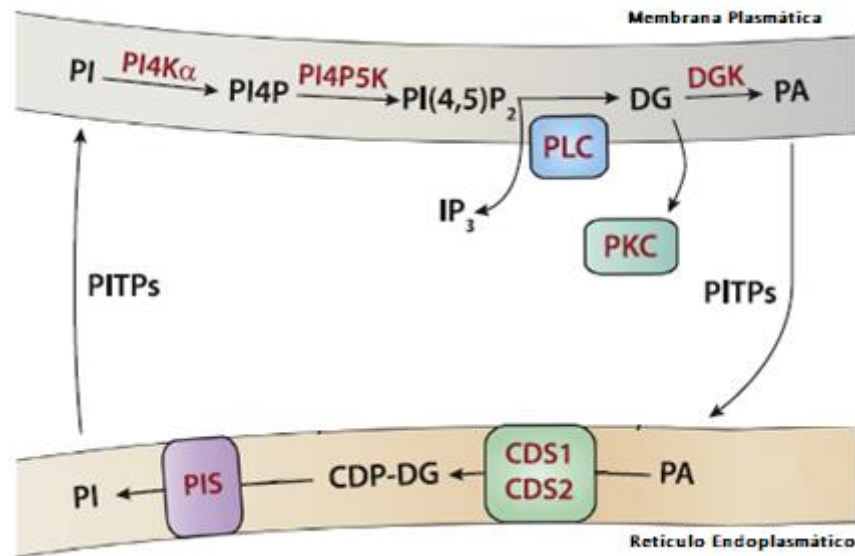


Figura 6: Esquema representativo da ressíntese de PI. A ressíntese de PI ocorre após a estimulação da PLC, que degrada PIP₂ em IP₃ e DAG. O AF produzido pela DGK após aumento nos níveis de DAG participa do ciclo do PI, por meio de enzimas específicas, no retículo endoplasmático. O PI produzido é transferido para a membrana plasmática para fosforilação em PIP₂. PI: fosfatidilinositol; PI4P: PI 4-fosfato; PI (4,5) P₂: fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato; PLC: fosfolipase C; IP₃: inositol (1,4,5) trifosfato; DG: diacilglicerol; PA: ácido fosfatídico; PITPs: proteínas de transferência de fosfatidilinositol; CDS: CDP-DG sintase; CDP-DG: CDP-diacilglicerol; PIS: PI sintase. Adaptado de: (BLUNSOM; COCKCROFT, 2020).

Alterações no equilíbrio entre os níveis intracelulares de DAG e AF podem resultar em diferentes efeitos. Por exemplo, a inibição farmacológica da DGK ocasiona acúmulo de DAG disponível para participar da síntese de 2-AG (MERIDA; GRAZIANI; SAKANE, 2017). Associado a este dado, foi relatado recentemente que a inibição da DGK potencializou a atividade do receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1), por meio da fosforilação causada por PKC (LIU; YUDIN; ROHACS, 2020). Este receptor, além de ser ativado por endocanabinoides (DE PETROCELLIS et al., 2000), participa da modulação da dor e inflamação (BARRIÈRE et al., 2020; HOLZER, 2011), e está envolvido na sensação térmica inflamatória (PABBIDI et al., 2008).

Alguns estudos correlacionam a atividade de DGK com processos inflamatórios. Em células do sistema imune, um subtipo específico de DGK, a DGKζ, limita a ativação e resposta das células T (ARRANZ-NICOLÁS; MÉRIDA, 2020) e a estimulação dessas células com LPS ou interleucina-2 (IL-2) aumenta a expressão de

DGK ϵ (YAMAMOTO et al., 2014). Já é descrito que a IL-2 induz a produção de AF por ativar a DGK em células de mielina de ratos (CHAKRABORTY et al., 2003; FLORES et al., 1999). Além disso, outras citocinas inflamatórias também estão relacionadas com o aumento da DGK. A estimulação com IL-1 β foi capaz de aumentar a expressão de DGK γ em células endoteliais vasculares (NAKANO et al., 2012). Em concordância, Chen e colaboradores relataram que a estimulação por LPS, TNF α e IL-1 β em células tumorais aumentou os níveis de DGK α , com consequente aumento da ativação da via AKT/NF κ B (CHEN et al., 2019).

Estudos de deleção genética da DGK confirmam esse envolvimento inflamatório. Recentemente foi identificado que a deficiência de DGK ζ resulta em produção reduzida de TNF α , IL-6 e IL-1 β , além de diminuição da fosforilação de STAT1 e STAT3, importantes fatores de transcrição associados à inflamação (MAHAJAN; MELLINS; FACCIO, 2020), além de atenuar a fagocitose de bactérias induzida por LPS (OKADA et al., 2012). Além disso, a deleção de DGK α inibiu consideravelmente a atividade de NF κ B (YANAGISAWA et al., 2007). Por fim, foi descoberto um possível envolvimento da DGK com a PGE $_2$. Após estímulo inflamatório com LPS ou IL-1 β , animais nocautes para DGK ϵ foram incapazes de induzir COX-2 e PGE $_2$, mas ainda não se sabe por qual mecanismo (LIU et al., 2021a; ZHU et al., 2016).

2.2.2. Inibição farmacológica da DGK

São dois os principais inibidores da enzima DGK disponíveis para uso experimental e melhor caracterizados, o R59949 e o R59022 (MERIDA et al., 2019). A administração do R59949 inibiu a produção de NO induzida por IL-1 β em células vasculares (SHIMOMURA et al., 2016), reduziu a eosinofilia (SINGH et al., 2020) e aboliu o desenvolvimento de neurites induzidas por DGK β (NAKAI et al., 2020). Em adipócitos humanos, o R59022 atenuou a expressão e secreção de IL-8, IL-6 e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (MARTINEZ et al., 2013). Somados a esses dados, a utilização dos dois inibidores, R59022 e R59949, reduziu a expressão da enzima iNOS após estímulo com IL-1 β em células endoteliais (NAKANO et al., 2012), e IL-6 em macrófagos (HAKUNO et al., 2018), ressaltando o envolvimento da via dos glicerofosfolipídios na inflamação.

Ambos, R59949 e R59022, são inibidores não seletivos de DGK por inibirem diferentes subtipos da enzima (SATO et al., 2013), mas é proposto que o R59949 seja um inibidor alostérico, atuando em um sítio diferente ao sítio ativo da enzima (JIANG et al., 2000; MERIDA et al., 2019). O R59949 inibe fortemente a atividade DGK do tipo I e atenua a atividade DGK do tipo II (SHIMOMURA et al., 2016), enquanto o R59022 inibe DGK tipo III e V e atenua DGK tipo I (SATO et al., 2013; VELNATI et al., 2020). Assim, o R59949 é relatado como mais eficiente na inibição das DGK tipo I que o R59022 (TORRES-AYUSO et al., 2014).

Foi identificado recentemente que, por semelhança estrutural com inibidores do transportador de serotonina (5-HT), como a ritanserina, ambos os inibidores de DGK também agem como antagonistas 5-HT (BORODA et al., 2017; VELNATI et al., 2020) (**Fig. 7**), ressaltando o cuidado necessário durante a análise de dados. Este é um dos motivos pelo qual estudos baseados na administração *in vivo* de inibidores de DGK são escassos (MERIDA et al., 2019).

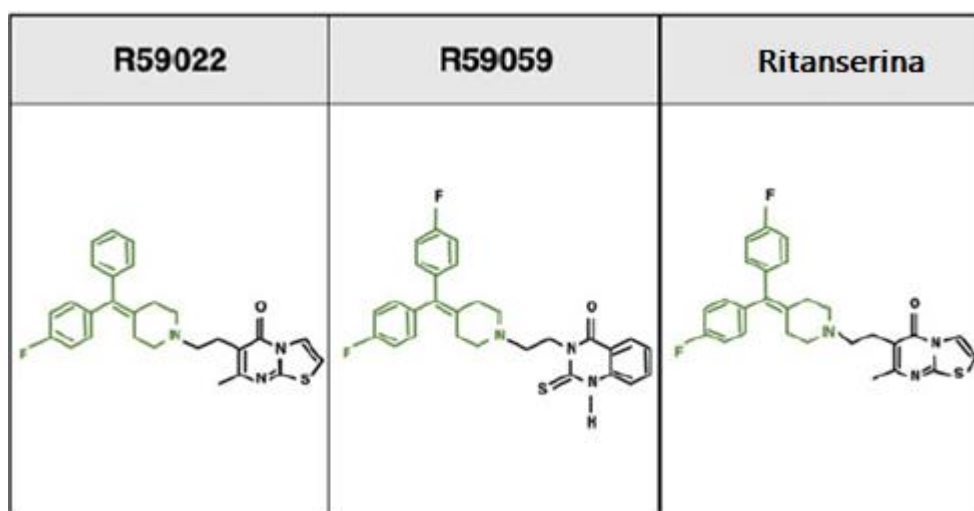


Figura 7: Semelhança estrutural entre os inibidores de DGK e a ritanserina. Estrutura dos inibidores com destaque em verde para a região necessária para atingir a atividade DGK. Fonte: (MERIDA et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL:

- Investigar o papel funcional da DGK na resposta febril e neuroinflamação induzidas por LPS em ratos.

3.2. ESPECÍFICOS:

- Analisar o efeito do tratamento com o inibidor de DGK (R59949) sobre a resposta febril;
- Analisar o efeito do tratamento com R59949 sobre a neuroinflamação, por meio da quantificação de PGE₂ e sobre o perfil de expressão gênica de AKT, NFκB, IL-6 e TNFα.
- Analisar o efeito do tratamento com R59949 sobre as concentrações circulantes de IL-6, TNFα e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos utilizando ratos (*Rattus norvegicus*), variedade *Wistar*, machos, pesando entre 180 e 200g. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB) e ficaram alojados em ambiente com temperatura de $24^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob um ciclo claro-escuro de 12 h, com água e alimentos fornecidos *ad libitum*. Os procedimentos cirúrgicos e os experimentos farmacológicos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas do IB/UnB, no período entre 8:00 e 18:00. Os protocolos para uso de animais estão de acordo com as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (SEI n.º 23106.010488/2021-33) (**Anexo 1**).

4.2. CIRURGIA PARA IMPLANTE DA CÂNULA INTRACEREBRO-VENTRICULAR

Anteriormente à cirurgia, as cânulas foram feitas a partir da agulha BD-7, com calibre 22G (0,7 mm de diâmetro externo e 10 mm de comprimento) de aço inoxidável e, em seguida, foram esterilizadas. Os animais foram 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 (ip). Os animais foram tricotomizados, posicionados e fixados em aparelho estereotático (Insight, Ribeirão Preto, SP). Após a assepsia da pele da parte superior da cabeça, os animais receberam uma injeção local (subcutânea) de lidocaína 2% e fenilefrina 0,04% (0,2 mL), e uma incisão, de aproximadamente 1 cm foi feita para a exposição da calota craniana, a fim de permitir a introdução da cânula intracerebroventricular (icv). Os parâmetros estereotáticos utilizados para a perfuração do crânio e posterior implantação da cânula tendo o bregma como referência foram: -1,5 mm antero-posterior e -1,6 mm lateralmente ao bregma, sendo a inclinação da barra incisal de -2,5 mm. As cânulas esterilizadas foram introduzidas no tecido cerebral com

coordenada ventral de 2,5 mm abaixo da superfície craniana. Todas as coordenadas utilizadas foram determinadas com base no Atlas de Paxinos e Watson (1986).

Para a fixação das cânulas foi utilizada prótese de acrílico auto-polimerizável com o auxílio de dois parafusos na calota craniana. Logo após a cirurgia de implante de cânulas no ventrículo lateral dos animais e, ainda sob o mesmo procedimento anestésico, foi realizada a cirurgia para o implante de transmissores de aferição de temperatura.

4.3. CIRURGIA PARA IMPLANTE DE TRANSMISSORES DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONIAL

Para a aferição da temperatura corporal dos animais, foram implantados cirurgicamente na cavidade peritoneal dos ratos transmissores de temperatura (*Data LoggersSubcue*, Calgary Canadá). Os transmissores foram desinfetados em solução de álcool 70% (v/v; imersão por 30 min). Ainda sob efeito do procedimento anestésico descrito no item 4.2., após tricotomia e antissepsia da pele, foi feita uma incisão e o transmissor lavado com solução salina estéril foi inserido na cavidade peritoneal. Em seguida, o músculo e a pele da incisão foram suturados separadamente. Após a cirurgia os animais receberam tratamento com antibiótico Terramicina (10 mg/kg) e Meloxicam (2 mg/kg). Aguardou-se um período de recuperação de sete dias para a realização dos experimentos farmacológicos nos animais.

4.4. MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DOS RATOS

O processo de aferição da temperatura corporal foi realizado por 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 registrada em intervalos de 15 min, com início 1,5 h antes dos experimentos, prosseguindo até 5 horas após a injeção de LPS. 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). A temperatura basal de cada animal foi determinada pela média das aferições 2 h antes de qualquer tratamento.

4.5. EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS

4.5.1. Experimento 1 – Padronização da dose de R59949

Para determinar a dose do inibidor R59949 (Catalog Number D5794, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) capaz de influenciar a resposta febril induzida pelo LPS em nossas condições experimentais, diferentes doses foram avaliadas quanto ao seu efeito antipirético. Os animais receberam R59949 nas doses de 1, 2 e 4 µg/rato ou seu veículo (tween 80 1% salina) por via icv. Após 30 minutos do tratamento, os animais receberam injeção endovenosa de LPS (endotoxina de *E. coli* 0111:B4, Sigma ChemCo., St. Louis, EUA) na dose de 5 µg/kg ou seu veículo (solução salina, 2 mL/Kg). A partir de então, cada animal teve sua temperatura corporal aferida a cada 15 min, durante 5 h. Em seguida, cada animal foi eutanasiado para a retirada dos transmissores de temperatura.

4.5.2. Experimento 2 – Coleta das amostras para análise

Após a escolha da dose de R59949 e determinação do melhor tempo para coleta das amostras, o procedimento experimental foi reproduzido. Foi administrado aos animais R59949 na dose de 2 µg/rato ou seu veículo (tween 80 1% salina) por via icv 30 min antes da administração de salina estéril (0,9%, 2 mL/Kg) ou LPS (5 µg/kg via endovenosa). Quatro horas após a administração do LPS os animais foram anestesiados para coleta de sangue e então eutanasiados por decapitação para a dissecação do hipotálamo.

Primeiramente foi feita incisão no tórax do animal para expor o coração. Com uma seringa heparinizada, foi feita punção no ventrículo direito para a coleta de sangue. Os animais foram então decapitados e a calota craniana aberta para que o cérebro fosse exposto. Para a dissecação do hipotálamo foram considerados os seguintes limites: borda anterior do quiasma óptico, borda anterior dos corpos mamilares e o sulco hipotalâmico lateral, com uma profundidade de 2 mm (PAXINOS; WATSON, 2013).

4.6. QUANTIFICAÇÃO DE PGE₂ NO HIPOTÁLAMO

Para a determinação da concentração de PGE₂ hipotalâmica, foi seguido o protocolo previamente descrito (FIGUEIREDO et al., 2012). Cada hipotálamo foi homogeneizado em 1 mL de meio RPMI contendo indometacina em 0,2 M Tris-HCl (2 mg/mL, pH 8,2) usando o Q125 Sonicator (Qsonica sonicators, Newtown, CT, EUA) e acidificado com solução de HCl (1 mol/ L 35%) para pH = 3,5–4,0. As amostras foram mantidas no escuro sob gelo até a centrifugação a 20.000 xg por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado a uma minicoluna (Sep-Pak® Classic C18 cartucho 360 mg, Waters Corporation, Milford, MA, EUA) e a PGE₂ foi eluída em 2 mL de etanol. A amostra foi seca usando um vácuo de velocidade (Hetovac® modelo CT110, Birkerød, Dinamarca) por 18 h.

No dia seguinte, a amostra seca foi ressuspensa no tampão de imunoenensaio enzimático. A concentração de PGE₂ nas amostras hipotalâmicas foi determinada usando o “Prostaglandin E2 ELISA Kit Monoclonal” (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) seguindo os procedimentos das instruções do fabricante, com um limite de detecção de 7,8 pg/mL.

4.7. EXTRAÇÃO DE RNA

Amostras de hipotálamos foram homogeneizadas em um tubo contendo cinco esferas de aço inoxidável (diâmetro, 2,3 mm) (BioSpec Products, Bartlesville, OK, Estados Unidos), três partículas afiadas de carboneto de silício (1 mm) (BioSpec Products) e TRIzol, por agitação usando um instrumento FastPrep-24 (M.P. Biomedicals, Solon, OH, Estados Unidos) (MARQUETI et al., 2018). Para homogeneizar completamente o hipotálamo, o processo de agitação foi repetido cinco vezes na velocidade 4. Os tubos foram mantidos em resfriamento com gelo por 2 min para evitar a degradação do RNA entre cada etapa de agitação. O RNA total foi extraído de acordo com o método TRIzol previamente descrito (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). Um espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, Estados Unidos) foi usado para quantificar as concentrações de RNA em cada amostra, determinando a taxa de absorbância de 260–280 nm (DE SOUSA NETO et al., 2022). Para a digestão do DNA foi utilizado o kit TURBO DNA-free (Ambion - Life

Technologies - 1907M), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram congeladas a -80°C . Posteriormente, as amostras foram congeladas a 80°C até a purificação.

4.8. TRANSCRIÇÃO REVERSA qRT-PCR

Para avaliar a expressão gênica no hipotálamo, um total de $1\text{ }\mu\text{g}$ de RNA extraído de cada amostra foi convertido em cDNA (volume final $20\text{ }\mu\text{L}$) usando a transcriptase reversa SuperScript [™] VILO [™] MasterMix (Invitrogen-Cat. 11755-010) de acordo com o fabricante protocolo. Para realizar a transcrição reversa, as amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, a 42°C por 60 minutos e a 85°C por 5 minutos antes de serem armazenadas a -20°C em freezer.

4.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Por meio de protocolos previamente descritos (DE SOUSA NETO et al., 2022), a qRT-PCR foi realizada usando o sistema TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA - Cat. 4304437). Dez μL de GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega - A6102) foram homogeneizados e combinados com $1\text{ }\mu\text{L}$ do primer 20x, uma quantidade de cDNA determinada de acordo com a curva padrão e água para um volume final de $20\text{ }\mu\text{L}$. A reação de amplificação foi realizada pelo QuantStudioTM3 (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A qRT-PCR foi realizada usando um sistema de PCR em tempo real QuantStudio 3 (Applied Biosystems) para os seguintes genes: interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), fator nuclear kappa b ($\text{NF}\kappa\text{B}$) e proteína quinase B (AKT).

4.10. PREPARO DE AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ERO E DE HEMOGLOBINA NITROSILADA POR RPE

Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes dos experimentos, em tampão Krebs HEPES (KHB) (NOX-7.6, Noxygen, Alemanha), dissolvido em água bi-destilada e deionizada. Preparou-se uma solução estoque com concentração de 10

mM com a spin probe: 1-hidroxi-3-metoxycarbonil-2,2,5,5- tetrametilpirrolidina (CMH) (NOX-2, Noxygen, Alemanha), dissolvida em KHB contendo 25 mM de deferoxamina (NOX-9, Noxygen, Alemanha), um quelante de ferro e trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (NOX-10, Noxygen, Alemanha), um quelante de cobre, na concentração de 5 mM. As soluções foram mantidas resfriadas durante todo o decorrer dos experimentos.

Para a coleta de sangue, os animais foram anestesiados 4 horas após a administração do LPS e as amostras de sangue foram coletadas lentamente com uma seringa heparinizada de 3 mL. Para a quantificação de hemoglobina nitrosilada (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.

Para a quantificação de ERO no sangue foi preparada uma solução de CMH a 400 μ M e heparina sódica (100 UI/ml) (Hepamax-S®, Blausiegel Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil). Foi adicionado sangue a essa solução na proporção 1:1, e incubado sob agitação por 30 min a 37 °C. Após esse tempo foi adicionado em uma seringa onde foi colocado 200 μ L de água, congelada em nitrogênio líquido, em seguida 50 μ L da amostra de sangue, que também foi congelada e então mais 200 μ L de água, congelando então todo o conteúdo da seringa. As amostras foram armazenadas a -80 °C até que as medidas em RPE fossem realizadas.

4.11. MEDIDAS DE RPE PARA QUANTIFICAÇÃO DE ERO E HBNO

RPE é uma técnica baseada na absorção de radiação eletromagnética, geralmente na região das micro-ondas, por uma amostra paramagnética, (como por exemplo, espécies com um ou mais elétrons desemparelhados), quando são submetidos a um campo magnético. Essas absorções acontecem apenas em combinações de frequências e campo magnético muito bem definidas, que dependem da espécie paramagnética e suas características (HAWKINS; DAVIES, 2014). A partir desse princípio foram otimizados os parâmetros para a leitura das amostras. As medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro de onda contínua Bruker EMXplus usando a banda X (9 GHz), em uma cavidade de alta resolução (ER 4119HS).

Para as medidas de HbNO os parâmetros utilizados foram: potência 10 mW, campo de modulação de 5 Gauss, frequência de modulação 100 kHz, tempo de varredura de 12 s e foi utilizado o espectro da média de 4 varreduras com 240 G de largura de varredura adicionados em conjunto para cada medição. Para as medidas de ERO, foi utilizada potência de 2 mW, campo de modulação de 5 Gauss, frequência de modulação 100 kHz, tempo de varredura de 10 s. Para mensuração da amplitude foi utilizado o espectro da média de 5 varreduras com 200 G de largura de varredura adicionados em conjunto para cada medição. Os parâmetros e a análise dos dados foram baseados em metodologia padronizada e adaptados de acordo com as necessidades do nosso estudo (GOMES, 2022).

Para a quantificação de HbNO, a quantidade de NO detectado foi determinada a partir da curva de calibração para a intensidade do sinal de RPE de eritrócitos tratados com concentrações conhecidas de nitrito (1, 10 e 100 μ M) e Na₂S₂O₄ (20 mg). Para a curva de calibração das medidas de ERO, foram preparadas amostras a partir de uma solução-mãe de 10 mM do padrão: 3-carboxi-proxilo (CP•) (NOX-8.2, Noxygen, Alemanha) preparado em KHB e diluído a concentrações de 0, 5, 10, 50, e 100 μ M.

Exatamente 450 μ L das amostras de calibração foram transferidos para seringas de 1 mL e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

4.12. QUANTIFICAÇÃO DE IL-6 E TNF α NO PLASMA

Para quantificação de IL-6 e TNF α , amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca durante a exsanguinação em tubos heparinizados e centrifugadas por 20 min a 3500 rpm a 4 °C para extração de plasma (AMORIM et al., 2020). O sobrenadante foi coletado em novos tubos e armazenado a -80 °C até análise posterior. A produção de IL-6 e TNF α foram avaliadas por ELISA, realizadas de acordo com as instruções do fabricante (*Catalog Number* RAB0311 e RAB0479, Sigma Aldrich, USA).

4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O índice térmico é um método bem aceito para evidenciar e analisar a amplitude das respostas térmicas, baseado na área sob a curva (AUC) (SARAMAGO et al., 2019). Definimos 36,5 °C como linha de base e calculamos a AUC de 1 a 5 h. Os valores para a AUC são expressos em unidades arbitrários (UA).

A variação de temperatura (ΔT) foi calculada pela diferença entre a temperatura obtida na 4h após a indução de febre (momento da eutanásia) e temperatura basal média (média das temperaturas aferidas 2 h antes da primeira administração).

Os dados de índice térmico, ΔT , os valores plasmáticos de HbNO e IL-6, quantificação de PGE₂, bem como os resultados de qRT-PCR foram analisados por análise de variância de duas vias (2-way ANOVA) (fator 1: estímulo e fator 2: tratamento), seguido pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. Para os dados de análise da temperatura corporal após estímulo febril foi feita análise por 2-way ANOVA (fator 1: tempo e fator 2: estímulo).

Outros resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e as comparações estatísticas foram feitas por análise de variância de três vias (3-way ANOVA) (fator 1: tempo, fator 2: estímulo e fator 3: tratamento), seguida pelo teste comparação múltipla de Bonferroni. Utilizamos o GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, EUA) para realizar as análises estatísticas descritas na legenda de cada figura. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da administração de LPS sobre a temperatura corporal

A dose utilizada de LPS promoveu aumento da temperatura corporal, com perfil bifásico, que iniciou cerca de 1,5 h após sua administração intravenosa, com picos de temperatura em torno de 2,5 e 4,25 h após a administração (**Fig. 8**). O aumento da temperatura que ocorreu próximo ao momento das injeções foi devido ao estresse ocasionado pelo manuseio dos animais, e foi observado de forma semelhante nos demais experimentos.

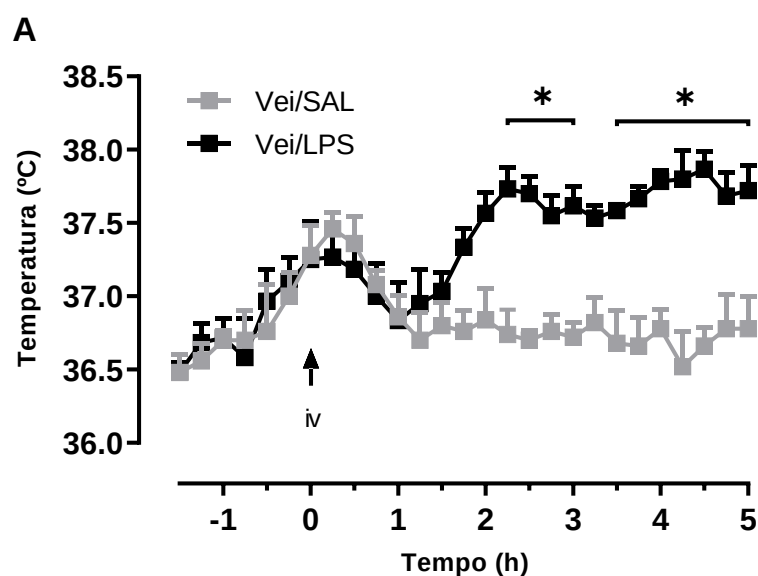


Figura 8: Febre induzida por LPS na dose de 5 µg/kg. O LPS foi administrado por via intravenosa (iv) na dose de 5 µg/Kg. Os animais do grupo controle receberam solução salina 0,9% (1 mL/Kg). Os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal (em °C) em 5-6 animais. * $p < 0,05$ Vei/LPS quando comparado ao valor correspondente do grupo Vei/SAL. Os dados foram analisados por two-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni.

5.2. Avaliação de febre e perfil de inibição do R59949 em diferentes doses

Para a avaliação do efeito do inibidor seletivo de DGK (R59949) sobre a febre, os animais foram tratados com 3 diferentes doses do inibidor (1, 2 e 4 µg em 2 µL) ou

seu respectivo veículo (*tween* 80 1% salina), via intracerebroventricular, 30 minutos antes da administração intravenosa de LPS (5 µg/kg) ou salina 0,9% (1 mL/kg).

A escolha das doses do inibidor R59949 baseou-se em artigos publicados aplicando outros modelos experimentais nos quais o inibidor foi utilizado (SATO et al., 2013; SHIMOMURA et al., 2016; VELNATI et al., 2019). Foi possível observar que o pré-tratamento com diferentes doses do R59949 inibiu o aumento da temperatura induzido pelo LPS (**Fig. 9A**). A administração icv das diferentes doses de R59949 causou efeitos dependentes da dose, na qual a dose intermediária (2 µg) inibiu o aumento de temperatura induzido pelo LPS, enquanto a menor e maior dose (1 e 4 µg, respectivamente) testadas não causaram diferença estatística no índice térmico (**Fig. 9B**).

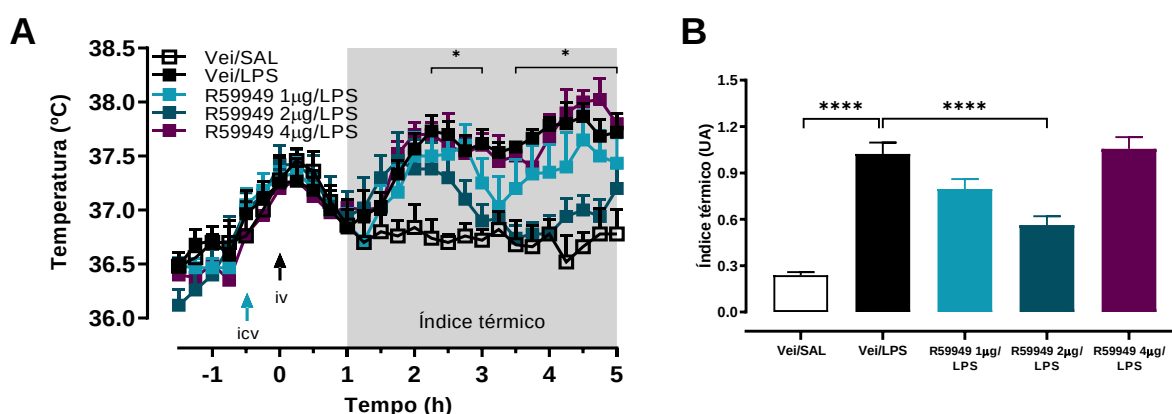


Figura 9: Efeito da administração de diferentes doses de R59949 sobre a temperatura corporal de ratos. R59949 foi administrado nas doses de 1, 2 e 4 µg (icv) em 2 µL ou seu veículo (Vei, 2µL) 30 minutos antes da injeção intravenosa de LPS (5 µg/kg) ou salina. (A) Curva temporal da temperatura corporal dos diferentes grupos de animais. As setas azul e preta representam o tempo de microinjeções icv e injeções iv, respectivamente. Os dados são expressos como média ± EPM da temperatura corporal (°C) em 5-6 animais. (B) Índice térmico calculado a partir da área sob a curva, de 1 a 5 h (conforme indicado no painel A). **** $p < 0,0001$ Vei/LPS quando comparado ao grupo Vei/SAL e R59949 2 µg/LPS quando comparado ao grupo Vei/LPS, * $p < 0,05$ Vei/LPS quando comparado ao grupo Vei/SAL. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni.

5.3. R59949 na dose de 2 µg inibe o aumento de temperatura induzido pelo LPS

A administração de LPS (5 µg/kg, iv) induziu um aumento na temperatura corporal, que começou cerca de uma hora após a injeção e aumentou progressivamente até 5 h. O pré-tratamento com R59949 na dose de 2 µg foi eficaz em inibir o aumento de temperatura a partir de 3 h do momento da injeção de LPS. Essa dose diminuiu em aproximadamente 63,8% a temperatura atingida no tempo de 4 h, quando comparados com 60,4% e 48,8% nos tempos de 3,5 h e 4,5 h respectivamente. Em 5 h após o estímulo, não houve diferença estatística da temperatura dos animais. Além disso, a dose de 2 µg não influenciou a temperatura dos animais quando administrada isoladamente no grupo que não recebeu estímulo febril. Por esse motivo, o momento escolhido para coleta das amostras para as análises subsequentes foi 4 h após a administração de LPS, com pré-tratamento de R59949 na dose de 2 µg (**Fig. 10**).

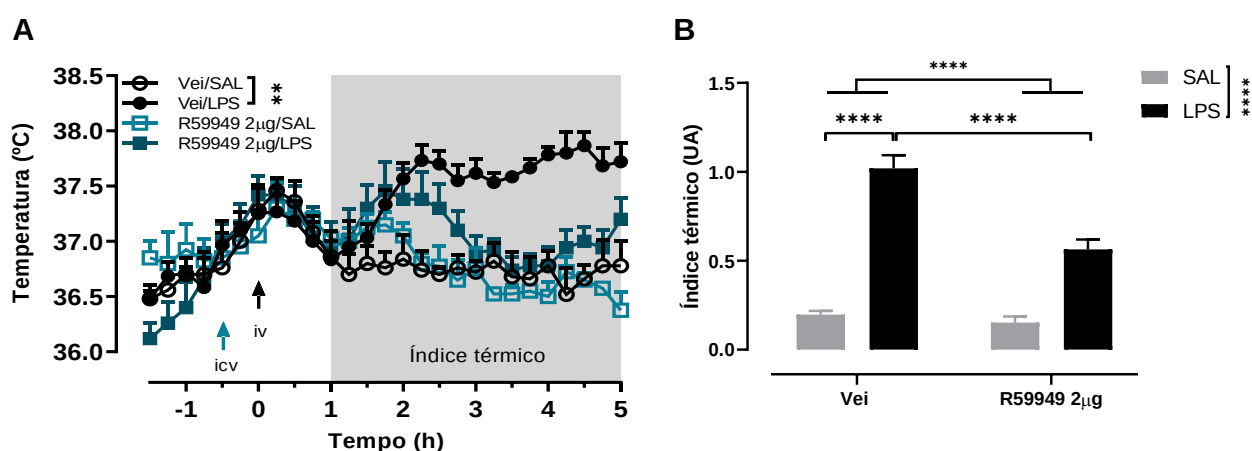


Figura 10: Efeito da administração de R59949 na dose de 2 µg/2 µL sobre a temperatura corporal de ratos. O R59949 (2µg/2 µL, i.c.v.) ou seu veículo (Veí, 2µL) foram administrados 30 minutos antes da injeção de LPS (5 µg/kg, i.v.) ou salina. (A) Mudanças na temperatura corporal dos animais no decorrer do tempo. Os dados são expressos como média ± EPM da temperatura corporal (°C) de 5-6 animais. (B) Índice térmico calculado a partir da área sob a curva, de 1 a 5 h (conforme indicado no painel A). **** p < 0,0001 R59949 2 µg/LPS quando comparado ao grupo Veí/LPS, **p < 0,01 estímulo LPS quando comparado com SAL. Os dados foram analisados por (A) *three-way* ANOVA e (B) *two-way* ANOVA, ambos seguidos pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni.

5.4. O pré-tratamento com R59949 inibe a produção de PGE₂ hipotalâmica

Após a definição da melhor dose e tempo para coleta, seguiu-se este desenho experimental para os experimentos seguintes. Os dados coletados apresentaram a variação de temperatura esperada, em que o pré-tratamento com R59949 inibiu o aumento de temperatura ocasionado pela administração de LPS (**Fig. 11A**). Como esperado, a administração de LPS ocasionou aumento significativo, cerca de 230%, na concentração de PGE₂ no hipotálamo dos animais. Ainda, o pré-tratamento com R59949 reduziu a concentração de PGE₂ hipotalâmica em 51%, sugerindo o envolvimento da via DAG-DGK-AF na produção de PGE₂ gerada durante a febre induzida por LPS (**Fig. 11B**).

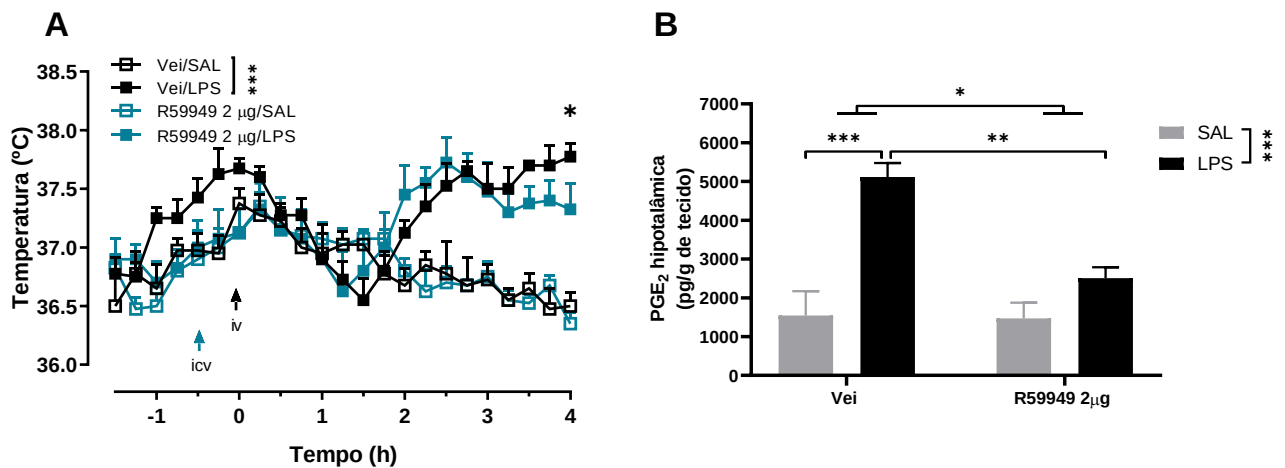


Figura 11: A inibição da DGK regula a concentração de PGE₂ no hipotálamo de ratos. O R59949 (2 µg/2 µL, icv) ou veículo (Vei, 2µL) foram administrados 30 minutos antes da injeção de LPS (5 µg/kg, i.v.) ou salina. (A) Mudanças na temperatura corporal dos animais no decorrer do tempo. Os dados são expressos como média ± EPM da temperatura corporal (°C) de 3-4 animais. As setas azul e preta representam o tempo de microinjeções icv e injeções iv, respectivamente. (B) Quantidade de PGE₂ por grama de tecido hipotalâmico, coletados 4 h após a injeção de LPS. ***p < 0,001 estímulo LPS quando comparado com SAL, **p < 0,01 R59949 2 µg/LPS quando comparado ao grupo Vei/LPS, *p < 0,05 Vei/LPS quando comparado ao grupo Vei/SAL. Os dados foram analisados por (A) *three-way* ANOVA e (B) *two-way* ANOVA, ambos seguidos pelo teste de comparação múltipla Bonferroni.

5.5. Análise de mRNA de animais tratados com R59949

A fim de analisar o efeito do R59949 nos níveis de expressão de mediadores inflamatórios centrais, os hipotálamos dos animais foram coletados após realização do procedimento experimental previamente descrito (**Fig. 12A**). A análise da expressão gênica foi normalizada pelo gene constitutivo RPLP0. Os dados de mRNA são apresentados em escala logarítmica como *fold change* em relação à média do grupo controle. Por essa razão, o valor do grupo “Vei/SAL” é sempre “1”.

Os grupos que receberam LPS apresentaram aumento na expressão de TNF α em cerca de 256% ($p < 0,001$ **Fig. 12E**) e de IL-6 em cerca de 39,4% ($p = 0,0359$), **Fig. 12D**), porém o uso do inibidor não alterou o perfil de expressão dessas citocinas.

A expressão de NF κ B não sofreu mudanças no grupo que recebeu LPS, resposta diferente da esperada nestas condições (**Fig. 12C**). O tratamento com R59949 não alterou estatisticamente a expressão do mRNA de NF κ B, nem de AKT, (**Fig. 12B e C**).

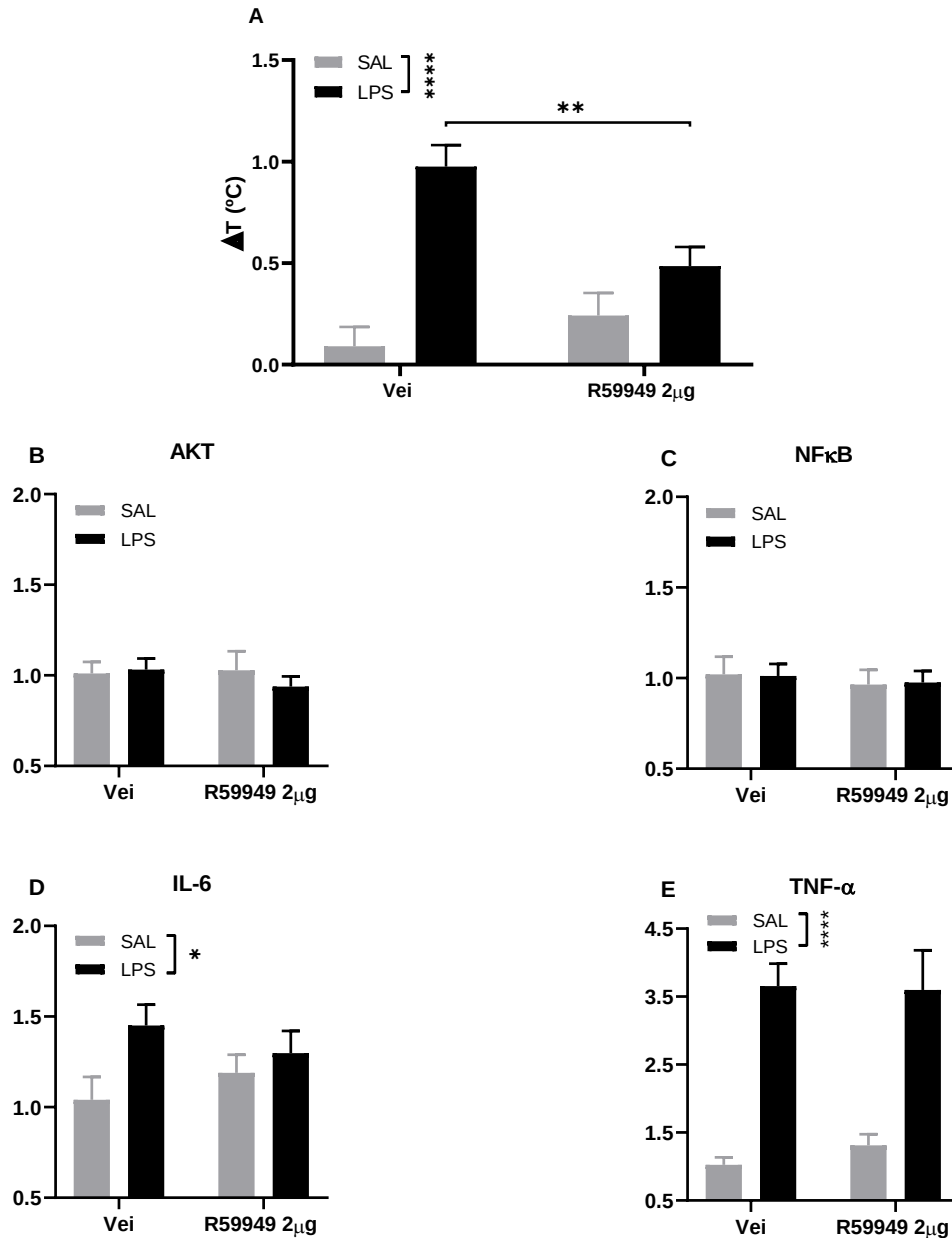


Figura 12: Efeitos do tratamento com R59949 na expressão de citocinas e fatores de transcrição inflamatórios. (A) Mudanças na temperatura corporal 4h após LPS em relação à temperatura basal. mRNA de IL-6, TNF α , AKT e NF κ B foram analisados em amostras do hipotálamo de animais que receberam o pré-tratamento com R59949 (2 μ g/2 μ L) ou seu veículo (Veil, 2 μ L). A expressão de AKT (B) e NF κ B (D) não foi alterada após administração de LPS ou tratamento com o inibidor R59949, enquanto houve aumento significativo na expressão de IL-6 (D) e TNF α (E) nos grupos que receberam o estímulo febril. Os níveis de expressão foram representados como *fold change* de cada gene, dispondo o quanto uma amostra apresentou diferença quando comparado ao grupo controle. **** $p < 0,0001$ e * $p < 0,05$ estímulo LPS quando comparado com SAL, ** $p < 0,01$ R59949 2 μ g/LPS quando comparado ao grupo Veil/LPS. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de 6-8 animais e analisados por *two-way* ANOVA, seguidos pelo teste de comparação múltipla Bonferroni.

5.6. O pré-tratamento com R59949 reduz os níveis circulantes de HbNO

A fim de avaliar o efeito sistêmico causado pela administração icv de R59949, analisamos a produção de citocinas plasmáticas, ERO e ERN periféricos durante a febre induzida por LPS. Para isso, quantificou-se a formação de IL-6 e TNF α plasmáticos e ERO e hemoglobina nitrosilada no sangue de animais tratados com R59949 (**Fig. 13A**).

A administração de LPS promoveu aumento na concentração plasmática de TNF α (137%, **Fig. 13C**), porém, diferentemente do esperado, não alterou a concentração de IL-6 (**Fig. 13B**). O tratamento com o inibidor previamente ao estímulo febril não alterou a concentração das citocinas analisadas, em comparação com os animais que receberam apenas o LPS (**Fig. 13 B, C**).

Para a detecção e quantificação de ERO, o sangue foi incubado com a *spin probe* CMH gerando uma amplitude de sinal característico no equipamento de RPE. O pré-tratamento com o inibidor da DGK não alterou a formação de ERO no sangue, notavelmente ampliada nos animais estimulados com LPS (159%, **Fig 13D**). Observou-se um aumento de cerca de 6 vezes na formação de HbNO nos animais que receberam estímulo pirogênico em relação ao grupo salina, e diminuição significativa quando pré-tratados com R59949 (**Fig. 13E**).

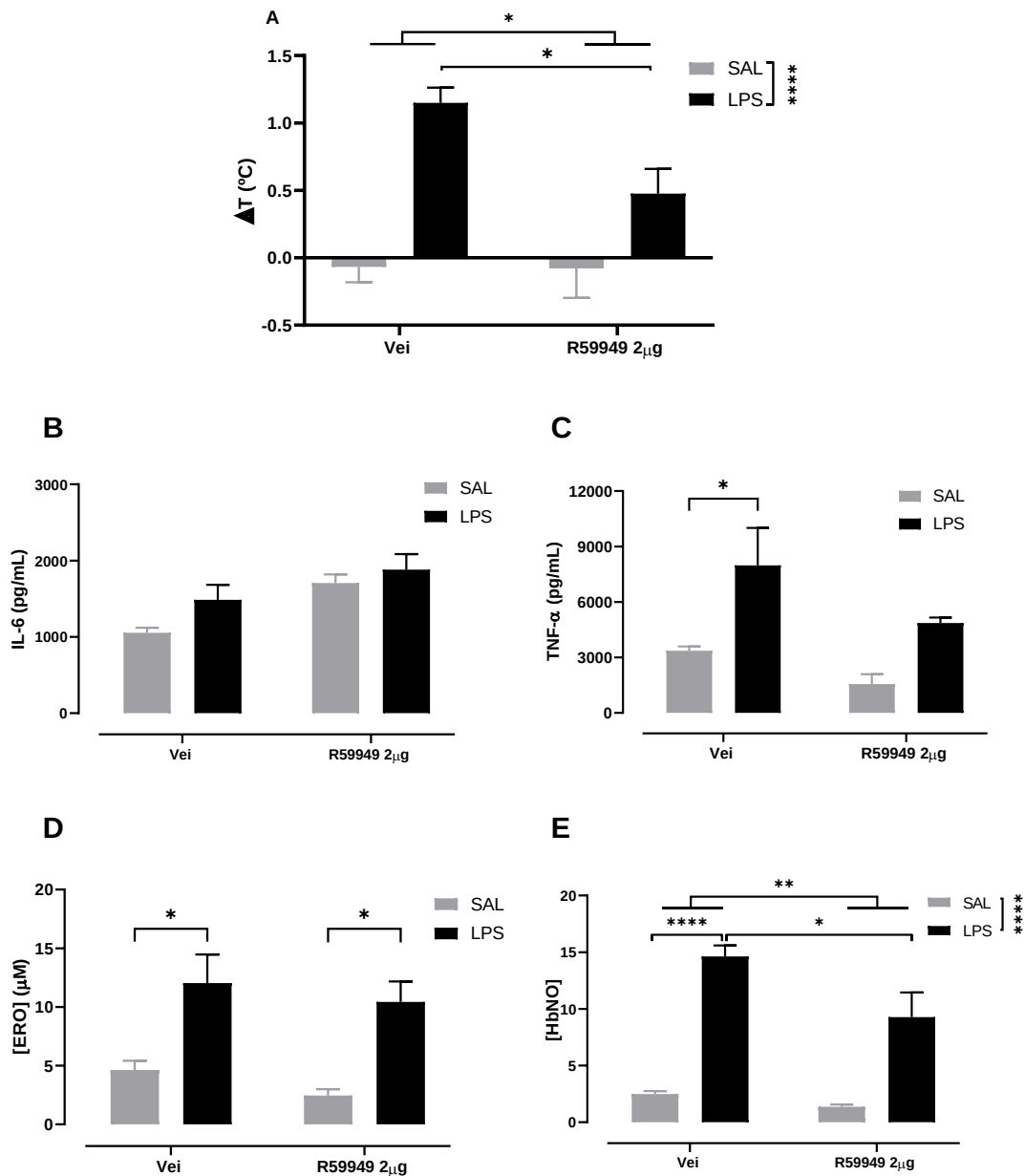


Figura 13: A inibição da DGK inibe os níveis circulantes de HbNO. (A) Mudanças na temperatura corporal 4h após LPS em relação à temperatura basal. (B) Concentrações plasmáticas de IL-6 (pg/mL). (C) Concentrações plasmáticas de TNF α (pg/mL). (D) Concentração de ERO no sangue total (μ M). (E) Concentração de HbNO no sangue total (μ M). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de 4-7animais e analisados por *two-way* ANOVA, ambos seguidos pelo teste de comparação múltipla Bonferroni.

Esses dados indicam que a regulação da via dos glicerofosfolípidios por meio da inibição da DGK pode ser eficaz na redução da febre. O efeito antipirético do R59949 envolve a diminuição nos níveis hipotalâmicos de PGE₂ e sistêmicos de HbNO e aponta a DGK como um importante regulador da resposta febril.

6. DISCUSSÃO

Este estudo apresentou o envolvimento da via dos glicerofosfolipídios na modulação da febre. Dados anteriores obtidos por nosso grupo demonstraram o aumento na abundância das isoformas β e γ de DGK no hipotálamo de ratos febris (FIRMINO et al., 2018). Os presentes resultados revelaram que a inibição farmacológica da DGK atenuou a febre induzida por LPS e ocasionou diminuição da concentração de PGE_2 , mediador final da febre, no hipotálamo de ratos. Em conjunto, esses dados nos estimularam a investigar os mecanismos adicionais envolvidos na regulação da febre e da neuroinflamação pela DGK. Dessa forma, com base na literatura criamos a hipótese de que a via de sinalização mediada por AKT/NF κ B, bem como a expressão de citocinas inflamatórias no hipotálamo teriam papel fundamental nestas condições. Em paralelo, percebemos a importância de se avaliar os efeitos sistêmicos da inibição central da DGK, pela quantificação das concentrações de IL-6, TNF- α , ERO e HbNO circulantes.

A administração intravenosa de LPS na dose utilizada (5 $\mu\text{g/Kg}$) gerou uma resposta febril característica, com dois picos de aumento de temperatura. A febre que ocorre como defesa do organismo em resposta ao LPS decorre da liberação de citocinas por células do sistema imune. Essas citocinas, principalmente IL-1 β , IL-6 e TNF α , estimulam receptores presentes em células endoteliais vasculares, que passam a expressar COX-2 e a produzir PGE_2 , que se difunde até neurônios da POA, para a geração da febre (ROTH; BLATTEIS, 2014).

Firmino et al. demonstraram que durante a febre ocorrem alterações em diversas vias de sinalização, como nas vias inflamatórias e metabólicas e, em decorrência, há alteração no perfil de expressão de muitas proteínas. Neste mesmo estudo foi identificado aumento em mais de 2 vezes da abundância da enzima DGK β e mais de 4x da DGK γ no hipotálamo de ratos que receberam estímulo com LPS (FIRMINO et al., 2018). Dados semelhantes também foram verificados em outros modelos experimentais. Em linhagens de células T humanas estimuladas com LPS houve um aumento transitório nos níveis de mRNA de alguns subtipos de DGK (YAMAMOTO et al., 2014), e em células cancerígenas houve aumento substancial na expressão de DGK α após estímulos inflamatórios, inclusive com LPS (CHEN et al.,

2019). Esses resultados sugerem que o aumento da expressão da DGK ocorre, ao menos de forma transitória, durante a inflamação induzida por LPS.

Assim, para confirmar se de fato a DGK participa da resposta do organismo frente uma infecção com LPS, e se esse envolvimento contribui ou para a geração ou para atenuação da febre, fizemos uso do inibidor R59949 em condições experimentais. Como são poucos os estudos que o utilizam *in vivo*, foi feita escolha de 3 doses para análise prévia. A escolha das doses do inibidor foi feita com base em aplicações de outros modelos experimentais que utilizaram o R59949 e confirmaram a inibição da DGK (SATO et al., 2013; SHIMOMURA et al., 2016; VELNATI et al., 2019). De fato, a inibição farmacológica da DGK atenuou a febre induzida por LPS, confirmando o envolvimento desta via de sinalização na manutenção da resposta febril. O pré-tratamento dos animais com R59949 nas doses de 1, 2 e 4 ug, seguido da administração de LPS resultou em uma curva dose-resposta em U, uma vez que apenas a dose intermediária (2 ug) foi capaz de atenuar o aumento da temperatura corporal gerado pelo LPS. Assim, a pré-administração de R59949 reduziu de forma significativa a resposta febril induzida por LPS. Esse resultado merece destaque, uma vez que apresenta diversas possibilidades de análises, já que ao inibir a DGK ocorre alteração de toda uma via de sinalização, gerando aumento das concentrações de DAG e diminuição nos níveis de AF, ou seja, interferindo com dois segundos mensageiros e suas cascatas de ativação.

Após a confirmação do envolvimento da DGK na resposta febril, testamos a hipótese de que a inibição da DGK poderia reduzir a produção de PGE₂ hipotalâmica, diminuindo assim a febre. É bem estabelecido que a PGE₂ atua na POA, principal região do hipotálamo responsável pela termorregulação, e trata-se do mediador terminal crítico da febre (HARDEN et al., 2015). Zamprônio e colaboradores (2015) relatam que, diante da deleção seletiva de PGE₂ sintase-1 microssomal, enzima sequencial na produção de PGE₂, camundongos não apresentaram febre após indução com LPS (ESKILSSON et al., 2014; ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015), evidenciando a importância deste eicosanoide na febre. Além disso, os principais tratamentos utilizados para controle da febre possuem mecanismos de inibição, seletiva ou não, da COX-2, enzima responsável pela produção de PGE₂ (OKA, 2018; ROTH et al., 2009). Nossos dados demonstraram que o aumento dos níveis de PGE₂ que ocorre após a administração de LPS, foi significativamente reduzido nos animais

tratados com R59949. Esse resultado sugere que inibição da de DGK e, consequentemente diminuição da sinalização de AF, pode diminuir a resposta febril por redução dos níveis hipotalâmicos de PGE₂.

As prostaglandinas são mediadores lipídicos sintetizados a partir do AA. O AA é liberado dos fosfolipídios de membrana celular por meio da ação da fosfolipase A₂. O AA liberado é oxigenado pela COX para formar alguns produtos, entre eles a PGE₂ (CHENG et al., 2021; PARK; CHRISTMAN, 2006). Essa relação entre DGK e PGE₂ já começou a ser proposta por Zhu e colaboradores (2016), que mostraram que camundongos nocautes para DGK ϵ não conseguem induzir, de forma eficaz, a expressão de COX-2 e consequentemente PGE₂, em modelo de glomerulonefrite. Esse resultado foi concordante com o modelo *in vitro*, em que macrófagos de animais nocautes para o mesmo subtipo de DGK, ainda que estimulados com LPS, apresentaram diminuição da expressão de COX-2 (ZHU et al., 2016). Ainda, recentemente, em células endoteliais silenciadas para DGK ϵ , a expressão de COX-2 foi comprometida (LIU et al., 2021a; TANG et al., 2019). Dessa forma é possível sugerir que a DGK está envolvida na indução de COX-2 e na síntese de PGE₂ hipotalâmica e, com base em nossos resultados, a diminuição da temperatura na febre induzida por LPS pode ocorrer por esta razão.

Dados na literatura sugerem o envolvimento de alguns subtipos de DGK na ativação da via PI3K/AKT/NF κ B em diversos tipos celulares e modelos experimentais (CHEN et al., 2019; GU et al., 2019; HAKUNO et al., 2018; LIU et al., 2021a, 2021b; TORRES-AYUSO et al., 2014; ZHANG et al., 2018). Chen e colaboradores (2019) apontam que a DGK α , estimulada por citocinas inflamatórias, ativam a via PI3K/AKT/NF κ B, uma vez que células de carcinoma silenciadas para DGK α apresentaram níveis menores de expressão de AKT fosforilada quando comparada com o grupo controle (CHEN et al., 2019). Ainda, em células de glioma silenciadas para DGK ζ a fosforilação de AKT foi menor do que em células de controle (GU et al., 2019). Além disso, modelos utilizando inibidores da DGK, R59949 (HAKUNO et al., 2018; TORRES-AYUSO et al., 2014; ZHANG et al., 2018) e R59022 (CHEN et al., 2019) apresentaram inibição da sinalização AKT após tratamento. Ainda, se constatou que a administração exógena de AF, produto da DGK, foi capaz de recuperar a atividade de AKT, antes diminuída pela inibição da DGK (CHEN et al., 2019; GOMEZ-

LARRAURI et al., 2021), sugerindo participação do AF na cascata de ativação da via AKT/NFκB.

A sinalização induzida por LPS estimula a síntese de citocinas pirogênicas tanto no local da infecção, como no SNC (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015). As citocinas coordenam o desenvolvimento e a atividade do sistema imunológico (ROSE-JOHN, 2018). Níveis elevados de algumas citocinas, como IL-6, TNFα e INF-γ, são observados em condições inflamatórias crônicas (JOHNSON; O'KEEFE; GRANDIS, 2018). A IL-6 induz a produção de fatores pró-inflamatórios e promotores de angiogênese, além de estimulação de células B, funções metabólicas e importante mediador na indução da febre (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; JOHNSON; O'KEEFE; GRANDIS, 2018; ROSE-JOHN, 2018). A IL-6 é considerada uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, apenas o bloqueio de sua sinalização foi suficiente para inibir o estado inflamatório, e esse mecanismo já é utilizado na prática clínica para tratamento de doenças autoimunes (ROSE-JOHN, 2020). O TNFα é uma citocina importante durante a resposta inflamatória e participa da patogênese de algumas doenças inflamatórias e autoimunes (JANG et al., 2021). Somado a isso, em modelo inflamatório, *in vivo* e *in vitro*, o silenciamento de DGKζ diminui a expressão de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNFα (MAHAJAN; MELLINS; FACCIO, 2020).

Sendo assim, testamos a hipótese de que a inibição da DGK atenua a resposta febril gerada pelo LPS por meio da diminuição da expressão de AKT e, consequentemente, de NFκB, resultando na diminuição na expressão de citocinas inflamatórias. Sob os mesmos procedimentos experimentais, realizamos análises de qRT-PCR em hipotálamos de ratos tratados com R59949 e seu controle no modelo de febre induzida por LPS, e analisamos o perfil de expressão dos genes IL-6, TNFα, NFκB e AKT.

No modelo experimental apresentado neste estudo, não foram observadas alterações nos níveis de expressão gênica de AKT ou NFκB no hipotálamo de ratos tratados com R59949 e estimulados com LPS comparados aos seus controles. Este resultado sugere que atenuação de temperatura gerada pela inibição da DGK pode não ocorrer pela via PI3K/AKT/NFκB no tempo analisado, porém esse dado não exclui a possibilidade do envolvimento desta via em um momento anterior, já que no cérebro, o NFκB é um dos primeiros fatores de transcrição induzidos pelo LPS ((DAMM et al., 2013; RUMMEL, 2016). Este resultado possibilita debate, uma vez que na literatura

se considera, para análise, a expressão da forma fosforilada (ativada) de AKT, não da expressão de sua forma constitutiva, uma vez que este valor pode não ser alterado (CAI et al., 2022; GU et al., 2019; ZHANG et al., 2018). Além do mais, não é esperado que, após estimulação com LPS, não haja aumento nos níveis de NFκB, posto que é bem estabelecido que durante exposição ao LPS há maior ativação (CASAS et al., 2021; FAN; MAO; YANG, 2013; SIMPSON; OLIVER, 2020) e expressão (CHEN et al., 2019) do fator de transcrição NFκB. Além disso, como para AKT, a validação do aumento da ativação de NFκB se dá por meio da razão entre sua forma fosforilada (ativa) e não fosforilada, representando se houve aumento efetivo de sua translocação nuclear para início da transcrição gênica.

Como esperado, os animais que receberam LPS, independente se tratados ou não com R59949, apresentaram maiores níveis de expressão de IL-6 e TNFα no hipotálamo, já que a ativação do sistema imune gerada pela presença de um PAMP ocasiona liberação maciça de citocinas para auxiliar este mecanismo de defesa do hospedeiro (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015). Porém, este dado sugere que não é por meio de alteração nos níveis de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNFα) hipotalâmicas que o R59949 atenua a resposta febril induzida pelo LPS.

É bem estabelecido que a estimulação com LPS *in vivo* (NOGUEIRA et al., 2017; SCHNEIDERS et al., 2015) e *in vitro* (HAN et al., 2017) em ratos ocasiona aumento das concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF-α. Em modelo de inflamação sistêmica induzida pelo LPS em ratos, este aumento pode ser observado em dois momentos, 120 e 360 minutos (2 e 6 horas), após o estímulo (SARAMAGO et al., 2019). O TNF-α é a primeira das citocinas pirogênicas a aparecer na corrente sanguínea após injeção sistêmica de LPS, seguido por uma maior elevação de IL-6 (ROTH; BLATTEIS, 2014). Nestas condições, o aumento do TNF-α é relatado como rápido e transitório na circulação sanguínea (HARDEN et al., 2015), porém a administração icv de TNF-α é capaz de aumentar a temperatura corporal em ratos (BRITO et al., 2016).

Da mesma forma, a IL-6 é crítica para a febre induzida por LPS. Blomqvist e Engblom (2018) relatam que animais nocautes para IL-6 não apresentam resposta febril ao LPS. Em animais que apresentavam deleção do receptor endotelial de IL-6, a resposta febril ocasionada pela administração periférica de LPS foi atenuada (ESKILSSON et al., 2014).

Dessa forma, como a sinalização ocasionada pelo LPS gera efeitos de transdução de sinal tanto ao nível de SNC quanto ao nível sistêmico, propôs-se quantificar as concentrações das citocinas IL-6 e TNF α no plasma sanguíneo de animais tratados ou não com R59949. Por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática foi possível identificar que a estimulação gerada pelo LPS proporcionou aumento na concentração de TNF α e IL-6 plasmáticos. Entretanto, o tratamento dos animais com R59949 não alterou esse aumento, indicando que a inibição da DGK atenua a febre independentemente da redução da concentração de citocinas periféricas.

Com a intenção de analisar o envolvimento da DGK com as ERO e ERN, foram realizadas análises de RPE, que permite a detecção de espécies paramagnéticas, como as ERO e ERN, com alta precisão e sensibilidade (HAWKINS; DAVIES, 2014).

Poucos são os estudos que investigam os efeitos da inibição da DGK sobre a concentração de ERO no organismo. Em nosso trabalho, a análise do sangue de animais tratados com R59949 não apresentou alterações significativas na produção de ERO circulante, sinalizando que os efeitos da diminuição do aumento da temperatura verificados após inibição da DGK não ocorrem por alteração nos níveis de ERO.

O NO modula relevantes termofetores, como a vasculatura cutânea, TAM e músculo esquelético (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014). A meia vida do NO é muito curta, da ordem de segundos, porém é possível avaliar sua biodisponibilidade por meio de sua reação com a hemoglobina (LJUBISAVLJEVIC; STOJANOVIC, 2015). Assim, para estimar os níveis circulantes de NO, é realizada quantificação de hemoglobina glicosilada no sangue total por meio de RPE, dado que a HbNO apresenta espectro de RPE característico, podendo ser quantificada pela análise de amplitude de sinal e comparando com a amplitude da curva de calibração (HOGG, 2010; STEVEN et al., 2017). Foi demonstrado que a inibição sistêmica não seletiva da síntese de NO, usando análogos de L-arginina, como L-NAME, abole ou pelo menos reduz febres induzidas por LPS (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014; STEINER; BRANCO, 2001).

Em estudo analisando células estimuladas com uma citocina inflamatória, IL-1 β , por meio de PCR, *western blotting* e análises densitométricas e fluorimétricas, a produção de NO foi atenuada quando tratadas com R59949 (SHIMOMURA et al.,

2016). Neste estudo, Shimomura e colaboradores (2016) indicam que o inibidor diminui os níveis de NO por atenuar a captação de L-arginina nas células incubadas com IL-1 β e tratadas com R59949. A hipótese apresentada é que a DGK pode estar envolvida no transporte de L-arginina e, conseqüentemente, na geração de NO pela NOS (SHIMOMURA et al., 2016). Ainda, em estudo prévio, o aumento da expressão de iNOS gerado pelo estímulo com IL-1 β em células vasculares, foi reduzida (NAKANO et al., 2012). Esses dados indicam um envolvimento da DGK na sinalização do NO.

Para entender então se a inibição da DGK poderia alterar os níveis de NO circulante, realizamos quantificação do HbNO do sangue total dos animais, por meio de RPE. Em nossos dados, o pré-tratamento com R59949 diminui os níveis de HbNO do sangue de animais estimulados com LPS.

Este é um dado de grande relevância no estudo do envolvimento da DGK na manutenção da febre. Há uma hipótese presente na literatura que a produção de TNF e a produção reduzida de NO sejam importantes para a disfunção do TAM (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018). Steiner aponta que a inibição sistêmica da síntese de NO demonstrou prejudicar o aumento induzido pela norepinefrina na termogênese do TAM (STEINER; BRANCO, 2001). O TAM é um órgão especializado para a produção rápida de calor. A exposição ao frio ou a presença de pirógenos ativa uma via de termorregulação que resulta na indução da termogênese do TAM (TAN; KNIGHT, 2018). As mitocôndrias dos adipócitos marrons presentes no TAM possuem a proteína desacopladora-1 (UCP-1), o que confere a capacidade de gerar calor por dissociar a energia derivada da cadeia transportadora de elétrons para produção de ATP (TUPONE; MADDEN; MORRISON, 2014).

Sabe-se que o NO aumenta os níveis cíclicos de GMP em vários tecidos, inclusive no TAM (STEINER; BRANCO, 2001). A via do NO-cGMP intensifica a função do TAM durante a exposição ao frio, ou seja, quando ocorre a diminuição da temperatura ambiente, o NO estimula a produção de calor pelo TAM (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018). Nossos resultados apontam que o tratamento com R59949 atenua a febre e diminuiu a concentração de HbNO uma possível explicação seria que a diminuição da biodisponibilidade de NO diminui a atividade do TAM por meio da diminuição da atividade das UCP para geração de calor, ocasionando na atenuação da febre.

Há relatos que o papel pró-pirético do NO periférico não foi associado a alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014). Essa informação está em concordância com os nossos dados, uma vez que nas análises realizadas no sangue de animais tratados com R59949, os níveis de citocinas circulantes não apresentaram muitas alterações, enquanto o aumento de HbNO gerado pelo LPS foi reduzido no grupo tratado. Como este dado é bastante significativo e ainda não há estudos que relacionem o efeito da inibição da DGK com a sinalização de NO na resposta febril induzida por LPS, novos estudos precisam ser conduzidos para esclarecer esse resultado.

A sinalização da via DGK é ampla, uma vez que regula os níveis de dois segundos mensageiros, DAG e AF, que além de suas funções individuais, participam do ciclo de ressíntese do fosfatidilinositol. Assim, os efeitos observados da inibição de DGK podem estar associados tanto ao acúmulo de DAG, à diminuição de AF, ou à inibição do ciclo de ressíntese do fosfatidilinositol. O que torna o estudo do envolvimento da DGK em uma condição fisiológica específica, como a febre induzida por LPS, complexo e com inúmeras probabilidades e perspectivas.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo apresentamos a contribuição da DGK para a modulação da febre induzida por LPS. Nossos resultados demonstram que a sinalização da via DGK está de fato associada aos efeitos produzidos pelo organismo em resposta ao estímulo inflamatório e pirogênico. A inibição da DGK ocasionou atenuação do aumento da temperatura corporal esperado pela administração sistêmica de LPS, gerando menor produção de PGE₂ hipotalâmica e menor biodisponibilidade de NO nesta condição.

Nossos dados fornecem novas vertentes para estudo dos mecanismos envolvidos na manutenção da febre e para novas possibilidades de atuação da sinalização DGK, e seus efetores, no organismo.

Estudos complementares são necessários para compreender melhor os resultados obtidos neste trabalho a fim de reconhecer a DGK como um novo alvo molecular para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas.

8. PERSPECTIVAS

Para melhor compreensão do envolvimento da DGK na manutenção da febre induzida por LPS, alguns ensaios serão propostos a fim de complementar os resultados obtidos neste estudo.

Inicialmente confirmar se os resultados observados foram consequência da inibição da DGK ou se são efeitos do inibidor. Para isso é interessante analisar a atividade enzimática da DGK após o pré-tratamento com R59949. Além disso, quantificar os níveis de DAG e AF para confirmar se há acúmulo e inibição, respectivamente, após o uso do R59949. Por fim, investigar se o efeito da inibição da DGK pode ser reproduzido pela administração de um análogo do DAG, o 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol.

Para avaliar se a antipirese decorrente da inibição da DGK é dependente da ativação de PKC, propõe-se co-tratar os animais com um inibidor de PKC e verificar se ocorre reversão da febre. Estas análises trarão um norte para o entendimento de parte dos mecanismos envolvidos na diminuição da temperatura por inibição da sinalização DGK.

Ainda, para excluir de fato a possibilidade de inibição da via PI3K/AKT/NFκB, estudos de expressão gênica e *western blotting* da forma fosforilada da AKT e de subunidades de NFκB no modelo experimental realizado são necessários. Por fim, como a diminuição da biodisponibilidade de NO foi intensa, cabe ressaltar a importância de complementar os dados obtidos com análises mais específicas, como a quantificação de L-arginina após o tratamento com R59949 *in vivo* e análises do efeito tecidual da inibição da DGK em outros locais, como no TAM.

9. ANEXO 1

Brasília, 19 de fevereiro de 2021.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "PAPEL DA DIACILGLICEROL QUINASE (DGK) NA FEBRE E NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)", SEI n.º 23106.010488/2021-33, 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, na 148ª reunião ordinária, realizada em 10/02/2021. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus*, sendo 84 machos, com procedência do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. A presente declaração é válida pelo período de: 19/2/2021 a 31/12/2022.



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.

10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADACHI, N. et al. Immunocytochemical localization of a neuron-specific diacylglycerol kinase β and γ in the developing rat brain. **Molecular Brain Research**, v. 139, n. 2, p. 288–299, 2005.
- AKIMOTO, R. et al. DGK ζ depletion attenuates HIF-1 α induction and SIRT1 expression, but enhances TAK1-mediated AMPK α phosphorylation under hypoxia. **Cellular Signalling**, v. 71, p. 109618, 2020.
- AMORIM, M. R. et al. Baroreceptor denervation reduces inflammatory status but worsens cardiovascular collapse during systemic inflammation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- ARRANZ-NICOLÁS, J.; MÉRIDA, I. Biological regulation of diacylglycerol kinases in normal and neoplastic tissues: New opportunities for cancer immunotherapy. **Advances in Biological Regulation**, v. 75, n. September, p. 100663, 2020.
- ÁVILA-FLORES, A. et al. Modulation of the mammalian target of rapamycin pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 11, p. 10091–10099, 2005.
- BALDANZI, G.; MALERBA, M. DGK α in neutrophil biology and its implications for respiratory diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 1–17, 2019.
- BARBER, C. N.; RABEN, D. M. Roles of DGKs in neurons: Postsynaptic functions? **Advances in Biological Regulation**, n. November, 2019.
- BARRIÈRE, D. A. et al. Paracetamol is a centrally acting analgesic using mechanisms located in the periaqueductal grey. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 8, p. 1773–1792, 2020.
- BARTFAI, T.; CONTI, B. Fever. **TheScientificWorldJournal**, v. 10, p. 490–503, 2010.
- BIGARELLA, C. L.; LIANG, R.; GHAFARI, S. Stem cells and the impact of ROS signaling. **Development**, v. 141, n. 22, p. 4206–4218, 2014.
- BLITTERSWIJK, W. J. VAN; HOUSSA, B. Properties and functions of diacylglycerol kinases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 12, p. 595–605, 2000.
- BLOMQVIST, A.; ENGBLOM, D. Neural Mechanisms of Inflammation-Induced Fever. **Neuroscientist**, v. 24, n. 4, p. 381–399, 2018.
- BLUNSOM, N. J.; COCKCROFT, S. Phosphatidylinositol synthesis at the endoplasmic reticulum. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1865, n. 1, 2020.
- BOLDYREVA, L. V. et al. Fat of the gut: Epithelial phospholipids in inflammatory bowel diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, 2021.
- BORODA, S. et al. Dual activities of ritanserine and R59022 as DGK α inhibitors and serotonin receptor antagonists. **Biochemical Pharmacology**, v. 123, p. 29–39, 2017.
- BRANCO, L. G. S.; SORIANO, R. N.; STEINER, A. A. Gaseous mediators in temperature regulation. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1301–1338, 2014.
- BRITO, H. O. et al. Evidence of substance P autocrine circuitry that involves TNF- α , IL-6, and PGE2 in endogenous pyrogen-induced fever. **Journal of Neuroimmunology**, v. 293, p. 1–7, 2016.

CAI, M. et al. PLD1 promotes reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells and injury-induced neointima formation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1867, n. 1, p. 159062, 2022.

CASAS, J. et al. Lipin-1-derived diacylglycerol activates intracellular TRPC3 which is critical for inflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 24, p. 8243–8260, 2021.

CHAKRABORTY, G. et al. Interleukin-2 receptors and interleukin-2-mediated signaling in myelin: Activation of diacylglycerol kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. **Neuroscience**, v. 122, n. 4, p. 967–973, 2003.

CHEN, J. et al. The diacylglycerol kinase α (DGK α)/Akt/NF- κ B feedforward loop promotes esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) progression via FAK-dependent and FAK-independent manner. **Oncogene**, v. 38, n. 14, p. 2533–2550, 2019.

CHENG, G. et al. Detection of mitochondria-generated reactive oxygen species in cells using multiple probes and methods: Potentials, pitfalls, and the future. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 26, p. 10363–10380, 2018.

CHENG, H. et al. Role of prostaglandin E2 in tissue repair and regeneration. **Theranostics**, v. 11, n. 18, p. 8836–8854, 2021.

CHILDS, C. **Body temperature and clinical thermometry**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 157

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, 1987.

DAMM, J. et al. 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**, v. 71, p. 98–111, 2013.

DE PETROCELLIS, L. et al. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: Inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. **FEBS Letters**, v. 483, n. 1, p. 52–56, 2000.

DE SOUSA NETO, I. V. et al. Protective role of intergenerational paternal resistance training on fibrosis, inflammatory profile, and redox status in the adipose tissue of rat offspring fed with a high-fat diet. **Life Sciences**, v. 295, n. January, 2022.

DIKALOV, S. I.; HARRISON, D. G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 2, p. 372–382, 2014.

DROUGARD, A. et al. Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. FEB, p. 1–12, 2015.

DRUML, W. Fever in the critically ill: To treat or not to treat. **Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin**, v. 114, n. 2, p. 173–184, 2019.

ESKILSSON, A. et al. Distribution of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the mouse brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 522, n. 14, p. 3229–3244, 2014.

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, 2015.

FAN, Y.; MAO, R.; YANG, J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. **Protein and Cell**, v. 4, n. 3, p. 176–185, 2013.

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, 2018.

FAZIO, A. et al. Subcellular localization relevance and cancer-associated mechanisms of diacylglycerol kinases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 1–19, 2020.

FIGUEIREDO, M. J. et al. Febrile response induced by cecal ligation and puncture (CLP) in rats: Involvement of prostaglandin E2 and cytokines. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 201, n. 2, p. 219–229, 2012.

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

FLORES, I. et al. Diacylglycerol kinase inhibition prevents IL-2-induced G1 to S transition through a phosphatidylinositol-3 kinase-independent mechanism. **J Immunol**, v. 163, n. 2, p. 708–714, 1999.

GANESH, B. P. et al. Diacylglycerol kinase synthesized by commensal *Lactobacillus reuteri* diminishes protein kinase C phosphorylation and histamine-mediated signaling in the mammalian intestinal epithelium. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 2, p. 380–393, 2018.

GARAMI, A.; STEINER, A. A.; ROMANOVSKY, A. A. Fever and hypothermia in systemic inflammation. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 157, p. 555–597, 2018.

GOMES, B. R. B. **Avaliação do estresse nitrosativo durante a febre e a antipirese**. Brasília: [s.n.].

GOMES, B. R. B. et al. 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, 2018.

GOMEZ-LARRAURI, A. et al. Phosphatidic acid stimulates myoblast proliferation through interaction with Ipa1 and Ipa2 receptors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1–20, 2021.

GOTO, K.; FUNAYAMA, M.; KONDO, H. Cloning and expression of a cytoskeleton-associated diacylglycerol kinase that is dominantly expressed in cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 13042–13046, 1994.

GU, X. et al. DGK ζ plays crucial roles in the proliferation and tumorigenicity of human glioblastoma. **International Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 9, p. 1872–1881, 2019.

GUO, Z. et al. Diacylglycerol kinase γ predicts prognosis and functions as a tumor suppressor by negatively regulating glucose transporter 1 in hepatocellular carcinoma. **Experimental Cell Research**, v. 373, n. 1–2, p. 211–220, 2018.

HAKUNO, D. et al. Hepatokine α 1-Microglobulin Signaling Exacerbates Inflammation and Disturbs Fibrotic Repair in Mouse Myocardial Infarction. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2018.

HAN, Q. et al. 6-Shogaol attenuates LPS-induced inflammation in BV2 microglia cells by activating PPAR- γ . **Oncotarget**, v. 8, n. 26, p. 42001–42006, 2017.

HARDEN, L. M. et al. Fever and sickness behavior: Friend or foe? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 50, p. 322–333, 2015.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 708–721, 2014.

HISHIKAWA, D. et al. Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 5, p. 799–807, 2014.

HOGG, N. Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 2, p. 122–129, 2010.

HOLZER, P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 131, n. 1, p. 142–170, 2011.

HUANG, C.; FRETER, C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 924–949, 2015.

IGLESIAS GONZÁLEZ, P. A. et al. In vitro 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity: New insights on NFκB modulation. **Toxicology in Vitro**, v. 60, n. April, p. 400–411, 2019.

JANG, D. I. et al. The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf-α) in autoimmune disease and current tnf-α inhibitors in therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–16, 2021.

JIANG, Q. et al. Transcriptional activation and translocation of ancient NOS during immune response. **FASEB Journal**, v. 30, n. 10, p. 3527–3540, 2016.

JIANG, Y. et al. Selectivity of the Diacylglycerol Kinase Inhibitor Diacylglycerol Kinase Subtypes. **Science**, v. 59, n. 99, p. 763–772, 2000.

JOHNSON, D. E.; O'KEEFE, R. A.; GRANDIS, J. R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer Daniel. **Nat Rev Clin Oncol.**, v. 15, n. 4, p. 234–248, 2018.

KABAT, A. M.; PEARCE, E. J. Inflammation by way of macrophage metabolism. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 488–489, 2017.

KANO, T. et al. Both the C1 domain and a basic amino acid cluster at the C-terminus are important for the neurite and branch induction ability of DGKβ. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 447, n. 1, p. 89–94, 2014.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325, 2015.

KITA, Y. et al. Fever is mediated by conversion of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol to prostaglandin E2. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–12, 2015.

KOZAK, W. et al. Attenuation of lipopolysaccharide fever in rats by protein kinase C inhibitors. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 273, n. 3, p. R873–R879, 2017.

LIU, D. et al. Loss of diacylglycerol kinase ε causes thrombotic microangiopathy by impairing endothelial VEGFA signaling. **JCI Insight**, v. 6, n. 9, 2021a.

LIU, K. et al. Downregulation of Diacylglycerol kinase zeta (DGKZ) suppresses tumorigenesis and progression of cervical cancer by facilitating cell apoptosis and cell cycle arrest. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 1517–1529, 2021b.

LIU, L.; YUDIN, Y.; ROHACS, T. Diacylglycerol kinases regulate TRPV1 channel activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 295, n. 24, p. 8174–8185, 2020.

LIY, P. M. et al. Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 246, n. 22, p. 2399–2406, 2021.

LJUBISAVLJEVIC, S.; STOJANOVIC, I. Neuroinflammation and demyelination from the point of nitrosative stress as a new target for neuroprotection. **Reviews in the Neurosciences**, v. 26, n. 1, p. 49–73, 2015.

MAHAJAN, S.; MELLINS, E. D.; FACCIO, R. Diacylglycerol Kinase ζ Regulates Macrophage Responses in Juvenile Arthritis and Cytokine Storm Syndrome Mouse Models. **The Journal of Immunology**, v. 204, n. 1, p. 137–146, 2020.

MARQUETI, R. C. et al. Effects of aging and resistance training in rat tendon remodeling. **FASEB Journal**, v. 32, n. 1, p. 353–368, 2018.

MARTINEZ, K. et al. Diacylglycerol kinase inhibitor R59022 attenuates conjugated linoleic acid-mediated inflammation in human adipocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 3, p. 662–670, 2013.

MASSART, J.; ZIERATH, J. R. Role of Diacylglycerol Kinases in Glucose and Energy Homeostasis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 9, p. 603–617, 2019.

MEIER, K.; LEE, K. Neurogenic Fever: Review of Pathophysiology, Evaluation, and Management. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 2, p. 124–129, 2017.

MERIDA, I. et al. Diacylglycerol Kinase Malfunction in Human Disease and the Search for Specific Inhibitors. Em: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l: s.n.]. p. 1–45.

MÉRIDA, I. et al. Diacylglycerol kinase control of protein kinase C. **Biochemical Journal** (2019), v. 476, p. 1205–1219, 2019.

MÉRIDA, I.; ÁVILA-FLORES, A.; MERINO, E. Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. **Biochemical Journal**, v. 410, n. 3, p. 631.2-631, 2008.

MERIDA, I.; GRAZIANI, A.; SAKANE, F. Editorial: Diacylglycerol kinase signalling. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. SEP, p. 1–2, 2017.

MINCHEVA-TASHEVA, S.; SOLER, R. M. NF- κ B signaling pathways: Role in nervous system physiology and pathology. **Neuroscientist**, v. 19, n. 2, p. 175–194, 2013.

MIRICESCU, D. et al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: From molecular landscape to clinical aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–24, 2021.

MORITA, S. Y.; UEDA, K.; KITAGAWA, S. Enzymatic measurement of phosphatidic acid in cultured cells. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 9, p. 1945–1952, 2009.

MORRISON, S. F. Central control of body temperature. **F1000Research**, v. 5, p. 880–890, 2016.

NAIK, E.; DIXIT, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 3, p. 417–420, 2011.

NAKAI, H. et al. mTORC1 is involved in DGK β -induced neurite outgrowth and spinogenesis. **Neurochemistry International**, v. 134, n. December 2019, 2020.

NAKAMURA, Y. et al. **Prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons bidirectionally control body temperature via tonic GABAergic signaling**. [s.l: s.n.].

NAKANO, T. et al. Involvement of diacylglycerol kinase γ in modulation of iNOS synthesis in Golgi apparatus of vascular endothelial cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 8, p. 787–795, 2012.

- NAKANO, T. Roles of lipid-modulating enzymes diacylglycerol kinase and cyclooxygenase under pathophysiological conditions. **Anatomical Science International**, v. 90, n. 1, p. 22–32, 2015.
- NAPETSCHNIG, J.; WU, H. Molecular basis of NF- κ B signaling. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, n. 1, p. 443–468, 2013.
- NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, 2012.
- NOGUEIRA, J. E. et al. Effect of physical exercise on the febrigenic signaling is modulated by preoptic hydrogen sulfide production. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2017.
- OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 695–708, 2011.
- OKA, T. **Stress-induced hyperthermia and hypothermia**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 157
- OKADA, M. et al. DGK ζ is involved in LPS-activated phagocytosis through IQGAP1/Rac1 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 420, n. 2, p. 479–484, 2012.
- PABBIDI, R. M. et al. Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity. **Molecular Pain**, v. 4, p. 1–17, 2008.
- PALICZ, A. et al. Phosphatidic Acid and Diacylglycerol Directly Activate NADPH Oxidase by Interacting with Enzyme Components. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 5, p. 3090–3097, 2001.
- PARK, G. Y.; CHRISTMAN, J. W. Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 290, n. 5, p. 797–805, 2006.
- ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 family cytokines. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.
- ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 signalling in health and disease [version 1; peer review: 3 approved]. **F1000 Research**, v. 9, n. Faculty Rev, p. 1013, 2020.
- ROTH, J. et al. Molecular Aspects of Fever and Hyperthermia. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 229–245, 2009.
- ROTH, J.; BLATTEIS, C. M. Mechanisms of fever production and lysis: Lessons from experimental LPS fever. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1563–1604, 2014.
- 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, 2016.
- SAKANE, F. et al. The roles of diacylglycerol kinase α in cancer cell proliferation and apoptosis. **Cancers**, v. 13, n. 20, p. 1–13, 2021.
- SAKANE, F.; MIZUNO, S.; KOMENOI, S. Diacylglycerol Kinases as Emerging Potential Drug Targets for a Variety of Diseases : An Update. **Frontiers in Cell Developmental Biology**, v. 4, n. 82, p. 1–8, 2016.
- SAPER, C. B.; ROMANOVSKY, A. A.; SCAMMELL, T. E. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1088–1095, 2012.

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, n. September 2018, p. 119–128, 2019.

SATO, M. et al. Evaluations of the selectivities of the diacylglycerol kinase inhibitors R59022 and R59949 among diacylglycerol kinase isozymes using a new non-radioactive assay method. **Pharmacology**, v. 92, n. 1–2, p. 99–107, 2013.

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, 2015.

SHIBAIKE, Y. et al. 2-Carba cyclic phosphatidic acid inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in a human macrophage cell line. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 19, n. June, 2019.

SHIMOMURA, T. et al. R59949, a diacylglycerol kinase inhibitor, inhibits inducible nitric oxide production through decreasing transplasmalemmal L-arginine uptake in vascular smooth muscle cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 2, p. 207–214, 2016.

SHIRAI, Y. et al. Essential role of neuron-enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGK β in neurite spine formation, contributing to cognitive function. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, 2010.

SHIRAI, Y.; SAITO, N. Diacylglycerol kinase as a possible therapeutic target for neuronal diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2014.

SHULGA, Y. V.; TOPHAM, M. K.; EPAND, R. M. Regulation and functions of diacylglycerol kinases. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6186–6208, 2011.

SIM, J. A.; KIM, J.; YANG, D. Beyond lipid signaling: Pleiotropic effects of diacylglycerol kinases in cellular signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 1–23, 2020.

SIMPSON, D. S. A.; OLIVER, P. L. Ros generation in microglia: Understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 1–27, 2020.

SINGH, B. K. et al. Diacylglycerol kinase ζ promotes allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness through distinct mechanisms. **HHS Public Access**, v. 12, n. 597, p. 1–26, 2020.

SOARES, D. DE M. et al. The relevance of kalikrein-kinin system via activation of B2 receptor in LPS-induced fever in rats. **Neuropharmacology**, v. 126, p. 84–96, 2017.

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. 584–593, 2002.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever. **Journal of Thermal Biology**, v. 26, n. 4–5, p. 325–330, 2001.

STEVEN, S. et al. Time response of oxidative/nitrosative stress and inflammation in LPS-induced endotoxaemia—a comparative study of mice and rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, 2017.

TAFANI, M. et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

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

TANG, X. P. et al. Mitochondrial pyruvate carrier 1 functions as a tumor suppressor and predicts the prognosis of human renal cell carcinoma. **Laboratory Investigation**, v. 99, n. 2, p. 191–199, 2019.

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

TORRES-AYUSO, P. et al. Diacylglycerol kinase α promotes 3D cancer cell growth and limits drug sensitivity through functional interaction with Src. **Oncotarget**, v. 5, n. 20, p. 9710–9726, 2014.

TSUMAGARI, R. et al. DGK γ knockout mice show impairments in cerebellar motor coordination, LTD and the dendritic development of Purkinje cells through the activation of PKC γ . **eNeuro**, v. 7, n. 2, p. ENEURO.0319-19.2020, 2020.

TUPONE, D.; MADDEN, C. J.; MORRISON, S. F. Autonomic regulation of brown adipose tissue thermogenesis in health and disease: Potential clinical applications for altering BAT thermogenesis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 8 FEB, p. 1–14, 2014.

UEYAMA, T. et al. Superoxide Production at Phagosomal Cup/Phagosome through β I Protein Kinase C during Fc γ R-Mediated Phagocytosis in Microglia. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 7, p. 4582–4589, 2004.

USHIKUBI, F. et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 281–284, 1998.

VALENTINE, W. J. et al. Update and nomenclature proposal for mammalian lysophospholipid acyltransferases, which create membrane phospholipid diversity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 1, p. 101470, 2022.

VELNATI, S. et al. Identification of a novel DGK α inhibitor for XLP-1 therapy by virtual screening. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 378–390, 2019.

VELNATI, S. et al. Structure activity relationship studies on Amb639752: toward the identification of a common pharmacophoric structure for DGK α inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 96–108, 2020.

WALTER, E. J. et al. The pathophysiological basis and consequences of fever. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2016.

XIE, F. et al. The Potential Antipyretic Mechanism of Ellagic Acid with Brain Metabolomics Using Rats with Yeast-Induced Fever. **Molecules**, v. 27, n. 8, 2022.

XU, F. et al. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. **Cell and Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

YAMADA, K. et al. Regulatory role of diacylglycerol kinase γ in macrophage differentiation of leukemia cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, n. 1, p. 101–107, 2003.

YAMAMOTO, M. et al. Expression of mRNAs for the diacylglycerol kinase family in immune cells during an inflammatory reaction. **Biomedical Research (Japan)**, v. 35, n. 1, p. 61–68, 2014.

YANAGISAWA, K. et al. Diacylglycerol kinase α suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human melanoma cells through NF- κ B activation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 4, p. 462–474, 2007.

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

ZENG, C. et al. Lipidomics profiling reveals the role of glycerophospholipid metabolism in psoriasis. **GigaScience**, v. 6, n. 10, p. 1–11, 2017.

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. Figure 1, 2016.

ZHANG, J. et al. Establishment of a novel hepatic steatosis cell model by Cas9/sgrRNA-mediated DGK θ gene knockout. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 2, p. 2169–2176, 2018.

ZHAO, Z.-D. D. et al. A hypothalamic circuit that controls body temperature. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 8, p. 2042–2047, 2017.

ZHU, J. et al. Loss of diacylglycerol kinase epsilon in mice causes endothelial distress and impairs glomerular Cox-2 and PGE2 production. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 310, n. 26, p. 895–908, 2016.