



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

**DÉBORA DE SOUSA ALVES**

**PAPEL DO TRANSPORTADOR DE PIRUVATO MITOCONDRIAL (MPC-1) NA  
FEBRE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM RATOS**

**BRASÍLIA, 2019**

DÉBORA DE SOUSA ALVES

**PAPEL DO TRANSPORTADOR DE PIRUVATO MITOCONDRIAL (MPC-1) NA  
FEBRE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM RATOS**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

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

**Co-orientadora: Msc. Natália Carvalho Guimarães**

Brasília, 2019

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

AAL474p Alves, Débora de Sousa  
PAPEL DO TRANSPORTADOR DE PIRUVATO MITOCONDRIAL (MPC-1)  
NA FEBRE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM RATOS /  
Débora de Sousa Alves; orientador Fabiane Hiratsuka Veiga  
Souza; co-orientador Natália Carvalho Guimarães. --  
Brasília, 2019.  
47 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de  
Brasília, 2019.

1. Febre. 2. LPS. 3. MPC. 4. UK-5099. I. Souza, Fabiane  
Hiratsuka Veiga, orient. II. Guimarães, Natália Carvalho,  
co-orient. III. Título.

DÉBORA DE SOUSA ALVES

**PAPEL DO TRANSPORTADOR DE PIRUVATO MITOCONDRIAL (MPC-1) NA  
FEBRE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM RATOS**

**BANCA EXAMINADORA**

Fabiane H. V. de Souza

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

Natália Carvalho Guimarães

Co-Orientadora: Msc. Natália Carvalho Guimarães  
(Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina – UnB/FM)

Eduardo Antonio Ferreira

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferreira  
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)

Mani Indiana Funez

Profª Drª Mani Indiana Funez  
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)

BRASÍLIA, 2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que em tudo me foi generoso, me permitindo realizar um sonho de criança, com muito amor e perseverança.

Meu sincero agradecimento à minha orientadora, profa. Fabiane Souza, que me apresentou o mundo da pesquisa científica, me permitindo viver a experiência incrível de fazer novas descobertas na ciência. Agradeço por ter me ensinado a importância de questionar e discutir, de ser persistente, e tentar ir sempre além. Muito obrigada pela confiança desde a primeira monitoria (5º semestre), por toda a paciência e compreensão com minhas dúvidas, questionamentos e angústias, mas, principalmente, por ter sido tão presente na minha formação.

Agradeço com muito carinho à minha co-orientadora, Natália Guimarães, que tanto me ajudou, orientou e deu suporte. Agradeço por ter me feito entender os amores e temores de fazer ciência, pois muito aprendi com os nossos sofrimentos na bancada. Muito obrigada por todo o auxílio que me prestou, por ter estado sempre disponível quando precisei e por já ter virado noites me ajudando a interpretar resultados. Sou grata pela amiga que fiz e por ter realizado um lindo trabalho ao seu lado.

Ao grupo de febre – Bruna Gomes, Natália Guimarães e Gabriela Sousa, por toda a ajuda nos experimentos, nos estudos e pela companhia no laboratório. Foi uma experiência divertida por ter sido com vocês.

À Universidade de Brasília, lugar que foi minha segunda casa por tanto tempo, muito obrigada por tornar meu sonho real e me apresentar professores extraordinários que ensinam, com amor e esperança, o que é ser um profissional da saúde. Agradeço a cada um pela contribuição na minha formação.

Aos professores e colegas do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, agradeço o ambiente agradável de trabalho, as conversas para descontrair, e por toda ajuda que me foi dada.

Ao professor Antonio Galina Filho e seus alunos do Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial da UFRJ, pelo acolhimento e pela paciência em ensinar a realizar todo o procedimento experimental da Respirometria de Alta Resolução. À professora Andreza Fabro de Bem e seu grupo de pesquisa em

bioenergética mitocondrial, por todo o auxílio prestado na execução dos experimentos de oximetria. Aprendi muito com vocês.

Nada disso seria possível sem o suporte que obtive em casa. Agradeço à minha mãe, Lucimar, por ter se mantido firme e insistido na minha educação. Por ter comemorado comigo cada pequena vitória, cada prova vencida, cada semestre concluído, e por ter tido paciência. Agradeço aos meus irmãos, Gabriel, Lucas, Davi, Tiago, Paulo e Samuel, por terem estado ao meu lado, sempre me fazendo rir após um dia cansativo. Ao meu namorado, Otávio, por ter me apoiado desde o momento que escolhi cursar farmácia. Por acreditar em mim e me fazer acreditar, e, sobretudo, por ter sido meu equilíbrio, não me deixando desanimar.

Por fim, aos meus amigos de graduação e da vida, que sempre estiveram comigo, agradeço imensamente por todo o apoio e carinho. Cada momento de tensão e expectativa vividos nesses 5 anos foram únicos, agradeço por terem estado ao meu lado, me ouvindo e por compartilharem comigo esse sonho vivido.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida e à FAP/DF pelo financiamento do estudo.

*“Não temos nada se não acreditarmos.”*

C. S. Lewis

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de geração da febre induzida por pirógenos na APOHA .....	15
<b>Figura 2:</b> Geração de calor por dissociação da energia mitocondrial .....	16
<b>Figura 3:</b> Cadeia transportadora de elétrons e ATP-sintase .....	19
<b>Figura 4:</b> Entrada do piruvato na matriz mitocondrial .....	21
<b>Figura 5:</b> Reconstituição da atividade mitocondrial .....	23
<b>Figura 6:</b> Efeito do inibidor da MPC-1 (UK-5099) sobre a resposta febril induzida ..	29
<b>Figura 7:</b> Variação da temperatura corporal após 2,5h (150min) da administração de venosa LPS (5 µg/Kg) ou salina (0,9%) .....	30
<b>Figura 8:</b> Avaliação da função mitocondrial após administração de LPS .....	31
<b>Figura 9:</b> Efeito do inibidor de MPC-1 (UK-5099) sobre a atividade mitocondrial ...	33
<b>Figura 10:</b> Atividade inibitória do UK-5099 na presença de LPS em mitocôndrias hipotalâmicas .....	34



## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise da variância de uma via

APOHA – área pré-óptica do hipotálamo anterior

ATP – trifosfato de adenosina

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

COX-2 – enzima ciclooxigenase-2

CRM – capacidade respiratória máxima

CTE – cadeia transportadora de elétrons

EPM – erro padrão da média

ERO – espécies reativas de oxigênio

FADH<sub>2</sub> – dinucleotídeo de flavina e adenina

FCCP – carbonil cianeto 4- (trifluorometoxi) fenil-hidrazona

FO – capacidade de fosforilação oxidativa

g – gramas

h – horas

icv – intracerebroventricular

IL-1 – interleucina-1

IL-6 – interleucina-6

iv – intravenosa

kg – quilogramas

LEAK – estado de vazamento de prótons

LEAK-CI e II – vazamento de prótons dependente da ATP-sintase

LEAK-O – vazamento de prótons independente da ATP-sintase

LPS – lipopolissacarídeo

mg – miligramas

min – minutos

mL – mililitros

mm – milímetros

mM – milimolar

MPC – proteína transportadora de piruvato mitocondrial

NADH – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NF- $\kappa$ B – fator de transcrição nuclear kappa B

PAMP – padrões moleculares associados a patógenos

PGE<sub>2</sub> – prostaglandinas E<sub>2</sub>

ROX – taxa residual de consumo de oxigênio

SUIT – titulação de substratos-desacopladores-inibidores

TAM – tecido adiposo marrom

TLR – receptores do tipo *toll-like receptors*

TNF – fator de necrose tumoral

UCP-1 – proteína desacopladora 1

Vei – veículo

$\Delta T$  – Variação da temperatura corporal

$\mu$ g – microgramas

$\mu$ L – microlitros

$\mu$ M – micromolar

## RESUMO

A febre é o aumento da temperatura corporal que ocorre principalmente como resposta à infecção ou inflamação. O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal pirógeno exógeno utilizado no modelo de febre experimental. As respostas imunológicas desencadeadas pela febre são seguidas de alterações metabólicas, gerando mudanças no fluxo metabólico, no equilíbrio redox e na abundância de metabólitos. Estudo recente realizado por nosso grupo identificou aumento na expressão do transportador de piruvato mitocondrial (MPC-1) após estímulo com LPS, indicando participação do piruvato na resposta febril e, possivelmente, na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O complexo MPC é responsável pela entrada do piruvato na matriz mitocondrial. Neste estudo investigou-se o efeito da inibição farmacológica da MPC-1 por meio do inibidor UK-5099, na febre induzida por LPS e as alterações metabólicas causadas por esse estímulo em mitocôndrias hipotalâmicas, por meio da respirometria de alta resolução. Os resultados obtidos sugerem que, na febre induzida por LPS, há aumento da atividade mitocondrial, o que justifica o aumento da MPC-1, possivelmente como uma tentativa de compensar a falta de ATP. Além disso, o aumento do fluxo de elétrons mitocondrial possibilita a maior geração de ERO. A inibição da temperatura corporal pelo tratamento com UK-5099 pode decorrer da diminuição da produção de ERO, por minimizar a entrada de piruvato na matriz e a atividade da cadeia transportadora de elétrons. Estudos complementares encontram-se em andamento para confirmar essa hipótese.

**Palavras-chave:** febre, LPS, MPC, UK-5099.

## **ABSTRACT**

Fever is the increase in body temperature that occurs primarily as a response to infection or inflammation. Lipopolysaccharide (LPS) is the main exogenous pyrogen used in the experimental fever model. The immunological responses triggered by fever are followed by metabolic changes, generating changes in metabolic flux, redox balance and abundance of metabolites. A recent study by our group identified increased expression of the mitochondrial pyruvate transporter (MPC-1) after stimulation with LPS, indicating the participation of pyruvate in the febrile response and possibly in the production of reactive oxygen species (ROS). The MPC complex is responsible for the entry of pyruvate into the mitochondrial matrix. In this study we investigated the effect of pharmacological inhibition of MPC-1 by the inhibitor UK-5099 on LPS-induced fever and the metabolic changes caused by this stimulus in hypothalamic mitochondria through high-resolution respirometry. The results obtained suggest that, in LPS-induced fever, there is an increase in mitochondrial activity, which justifies the increase of MPC-1, possibly as an attempt to compensate for the lack of ATP. In addition, the increase of the mitochondrial electron flow allows the greater generation of ROS. Inhibition of body temperature by treatment with UK-5099 may occur from decreased ROS production, by minimizing the entry of pyruvate into the matrix and the activity of the electron transport chain. Complementary studies are under way to confirm this hypothesis.

**Keywords:** fever, LPS, MPC, UK-5099.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1. Termorregulação .....	2
2.2. Febre .....	3
2.2.1. Mecanismos de produção e retenção de calor .....	5
2.2.2. Febre experimental com uso de pirógenos exógenos.....	7
2.2.3. Perfil metabólico durante a febre .....	7
2.3. Carreador de piruvato mitocondrial 1 (MPC-1).....	10
2.4. Respirimetria de alta resolução .....	12
3. JUSTIFICATIVA.....	13
4. OBJETIVOS .....	14
4.1. Objetivos gerais .....	14
4.2. Objetivos específicos .....	14
5. METODOLOGIA.....	14
5.1. Animais.....	14
5.2. Cirurgia para implante de cânula intracerebroventricular (icv).....	15
5.3. Cirurgia para implante de transmissores .....	15
5.4. Mensuração da temperatura corporal dos ratos.....	15
5.5. Validação farmacológica .....	16
5.6. Respirimetria de alta resolução .....	16
5.6.1. Análise de dados .....	17
5.7. Análise estatística.....	18
6. RESULTADOS.....	18
6.1. O tratamento com inibidor da MPC-1 (UK-5099) reduz a febre em ratos .....	18
6.2. Atividade diferencial em mitocôndrias hipotalâmicas após administração de LPS .	19
6.3. Efeito do UK-5099 sobre a atividade mitocondrial em mitocôndrias hipotalâmicas	22
7. DISCUSSÃO .....	24
8. CONCLUSÃO .....	28
9. REFERÊNCIAS .....	29
<b>ANEXO</b> .....	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A febre é o aumento controlado da temperatura corporal, comum em quadros inflamatórios e infecciosos, decorrente de alterações hipotalâmicas (ROTH; BLATTEIS, 2014). A principal região responsável pelo controle da termorregulação e da febre é a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOHA) (ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015; 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).

O principal pirógeno utilizado no modelo de febre experimental é o lipopolissacarídeo (LPS), importante constituinte da membrana externa de bactérias gram-negativas (IANARO; TERSIGNI; D'ACQUISTO, 2009; ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015). O LPS estimula receptores do tipo *toll-like receptors* (TLR) em diversos tipos celulares (macrófagos, adipócitos, células de *Kupffer* e micróglia), aumentando a produção e liberação de mediadores inflamatórios que atuam na APOHA, para induzir a febre (ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015). Além disso, com a ativação do TLR-4, os macrófagos produzem citocinas pró-inflamatórias e ativam a glicólise aeróbia para gerar trifosfato de adenosina (ATP), independentemente da fosforilação oxidativa mitocondrial (KABAT; PEARCE, 2017).

A geração de ATP através da fosforilação oxidativa é a principal função das mitocôndrias. Entretanto, intermediários do ciclo do ácido cítrico têm sido descritos por atuação como moléculas de sinalização envolvidas também na regulação da angiogênese, câncer e inflamação (MILLS; KELLY; O'NEILL, 2017).

Estudos apontam que após a administração de LPS há aumento da glicólise, mas diminuição da fosforilação oxidativa, indicando dano mitocondrial. Essas mitocôndrias danificadas podem gerar maior número de espécies reativas de oxigênio (ERO). Há demonstrações de que as ERO podem atuar como sinalizadoras para ativar a produção de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo o processo inflamatório (KABAT; PEARCE, 2017).

Um importante carreador mitocondrial é a proteína carreadora de piruvato mitocondrial (MPC), responsável por transportar o piruvato do espaço intermembranar

para a matriz mitocondrial. O piruvato possui papel significativo na regulação metabólica por ser o produto da glicólise e um importante substrato para o ciclo do ácido cítrico. Dessa forma, sua modulação afeta direta ou indiretamente o metabolismo da glicose, lipídios e/ou aminoácidos (VACANTI et al., 2014).

Dados de análise neuroproteômica obtidos em nosso laboratório demonstraram que há aumento significativo na abundância da MPC-1 no tecido hipotalâmico de animais com febre induzida por LPS em relação a animais controle (FIRMINO et al., 2018). Esses achados podem sugerir que o aumento da expressão de MPC-1, além da regulação negativa da glicólise, pode ser resposta compensatória na tentativa de manter a produção de energia mitocondrial, balanço de neurotransmissores e regulação da homeostase da temperatura corporal.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Termorregulação

Na manutenção da homeostase, o controle da temperatura corporal é um fator de grande importância para garantir a função celular e a sobrevivência do organismo (MORRISON, 2016a). O sistema de termorregulação é responsável pela manutenção da temperatura interna do organismo (TAN; KNIGHT, 2018).

A rede neural do sistema termorregulatório é capaz de controlar constantemente as mudanças de temperatura corporal por meio do acionamento de diferentes respostas efetoras que aumentam a produção ou dissipação do calor (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015). Este sistema de manutenção é essencial, pois um desvio significativo da temperatura corporal pode afetar de forma prejudicial o metabolismo celular (ZHAO et al., 2017).

O hipotálamo é o coordenador central de integração da termorregulação e a região de maior importância para o controle da temperatura é a APOHA (TANSEY; JOHNSON, 2015). Os neurônios da APOHA são capazes de detectar mudanças locais de temperatura por meio do fluxo sanguíneo e em seguida ativar respostas termorreguladoras específicas para manutenção de uma temperatura constante (BARTFAI; CONTI, 2010). Estudos acrescentam que a partir de termorreceptores periféricos e centrais (pele, vísceras, medula espinhal e cérebro) há indução da atividade termorreguladora. Dessa forma, por se tratar de uma rede de integração,

muitas células da APOHA são capazes de vincular informações térmicas periféricas e centrais (TAN; KNIGHT, 2018; TANSEY; JOHNSON, 2015).

A atuação do hipotálamo é fundamentalmente integrativa, pois reúne uma série de informações sensoriais e compara essas entradas com temperaturas de referência (ponto de equilíbrio) da temperatura corporal. Em seguida, o hipotálamo ativa respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais para preservação da homeostase (SAPER; LOWELL, 2014).

Os neurônios hipotalâmicos presentes na APOHA podem ser diferenciados em sensíveis ao calor, ao frio ou insensíveis à temperatura. Os neurônios ativados pelo calor reduzem a atividade de neurônios ativados pelo frio, com respostas voltadas à liberação de calor e resfriamento corporal. Já os neurônios sensíveis ao frio, além de reduzirem a atividade de neurônios sensíveis ao calor, ativam mecanismos de termogênese e conservação de calor (ZHAO et al., 2017). Assim, são quatro as principais respostas fisiológicas para a manutenção da temperatura: termogênese do tecido adiposo marrom (TAM), controle do fluxo sanguíneo, tremores e resfriamento evaporativo (TAN; KNIGHT, 2018).

## 2.2. Febre

Em humanos, a temperatura corporal tem seu valor normal em torno de 37 °C. Um aumento similarmente pequeno na temperatura (1-4 °C) já pode ser caracterizado como febre (BARTFAI; CONTI, 2010). A febre é o aumento controlado da temperatura corporal que ocorre comumente como consequência à infecção ou inflamação, não excluindo seu envolvimento em causas não infecciosas (BLOMQUIST; ENGBLOM, 2018; ROTH; BLATTEIS, 2014; TAN; KNIGHT, 2018).

A febre é considerada uma resposta integrada capaz de envolver a ativação de processos relacionados à produção e conservação de calor e à inibição da perda de calor. Para isso, o sistema imune inato e o circuito neuronal (central e periférico) devem ser bem coordenados e integrados (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; ZAMPONIO; SOARES; SOUZA, 2015).

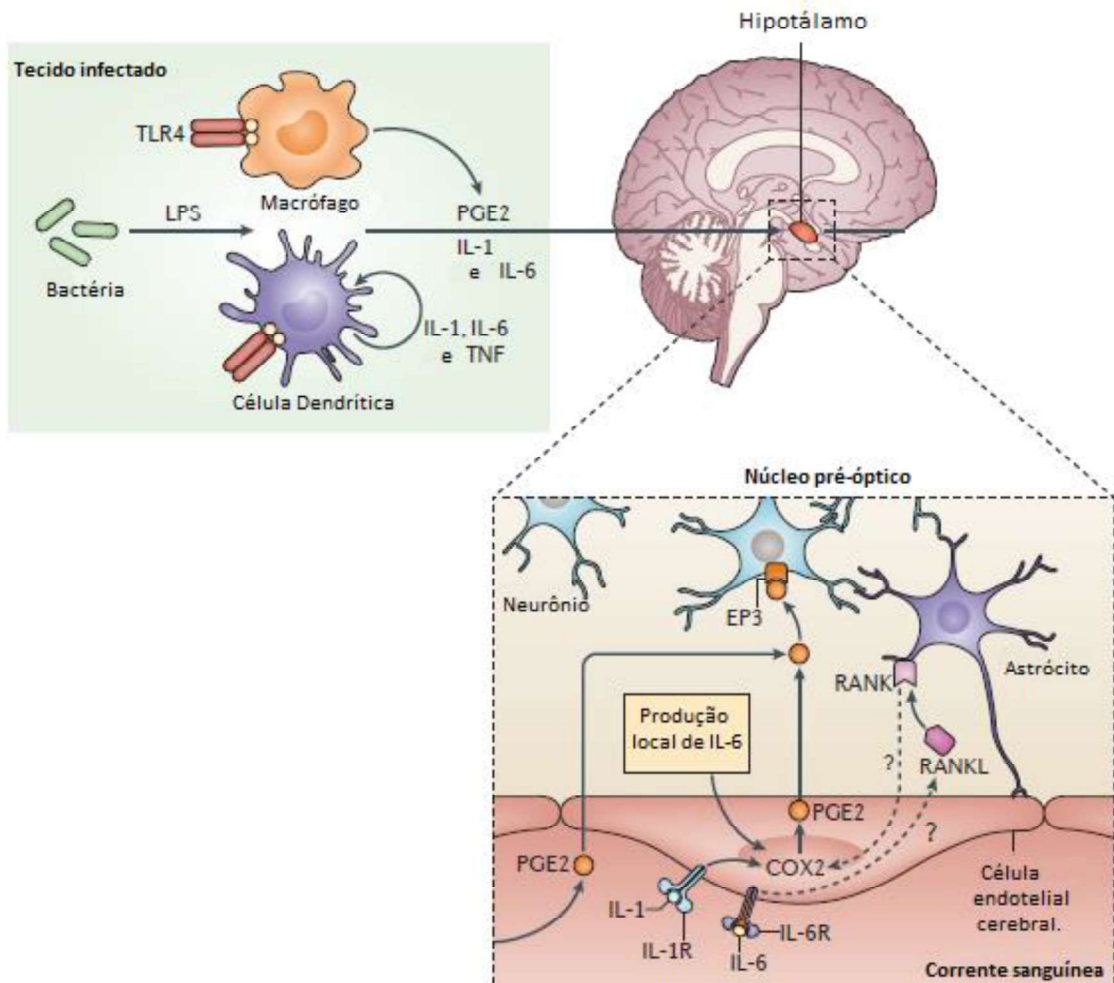
Pirógenos são substâncias com capacidade de induzir a febre e podem ser diferenciados em pirógenos endógenos e exógenos. Assim, a febre pode ocorrer mesmo diante de diferentes estímulos (bactérias, vírus, emocionais ou trauma) (BARTFAI; CONTI, 2010). O envio de informações pirogênicas da periferia para o



cérebro acontece por mecanismos neuronais e humorais. Essas vias estão envolvidas na gênese das fases precoces (via neural) e tardias (via humoral) da resposta febril (ROTH; BLATTEIS, 2014). Dessa forma, o sistema que transmite informações inflamatórias por meio de mediadores no sangue é a chamada via humoral da febre. Porém, mesmo na ausência de mediadores circulantes, as informações são transmitidas através da via de sinalização neural (RUMMEL, 2016).

A detecção imune da infecção começa com a ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) a receptores de reconhecimento de patógenos, como os TLR, encontrados em células imunológicas circulantes ou residentes (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; HARDEN et al., 2015). Os TLR podem ativar cascatas de transdução de sinal em células imunes, estimulando a síntese de citocinas dependentes do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B), incluindo a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-6 (IL-6) (BARTFAI; CONTI, 2010; ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015). Essas citocinas são transportadas pelo sangue ao encontro de receptores específicos nas células endoteliais hipotalâmicas. Com essa estimulação, ocorre a indução da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima responsável pela oxidação do ácido araquidônico, presente na membrana plasmática, em prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), gerando a resposta febril (ROTH; BLATTEIS, 2014; EVANS; REPASKY; FISHER, 2015).

A PGE<sub>2</sub> produzida pelas células endoteliais hipotalâmicas atua em receptores EP<sub>3</sub> presentes na APOHA para provocar elevação da temperatura corporal por afetar o ponto de equilíbrio da temperatura (BARTFAI; CONTI, 2010; SAPER; LOWELL, 2014). A PGE<sub>2</sub> é capaz de diminuir a taxa de disparo dos neurônios sensíveis ao calor (diminuindo a perda de calor, a vasoconstrição e a sudorese), o que resulta em aumento da temperatura corporal e consequente geração da febre. Assim, a PGE<sub>2</sub> ativando receptores EP<sub>3</sub> na APOHA é o mediador final da febre (**Figura 1**) (MACKOWIAK; BOULANT, 1996; WALTER et al., 2016; BLOMQUIST; ENGBLOM, 2018). Com a ativação do receptor EP<sub>3</sub> há indução de liberação de noradrenalina pelo sistema nervoso simpático. A noradrenalina promove a elevação da temperatura corporal aumentando a termogênese no TAM e induzindo a vasoconstrição (MENGA et al., 2018).



**Figura 1:** Mecanismo de geração da febre induzida por pirógenos na APOHA. A ativação de receptores do tipo TLR por LPS ativam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que, na área pré-óptica do hipotálamo, aumentam a expressão de COX-2 endotelial. Com isso há aumento da produção de PGE<sub>2</sub>, que será reconhecido por receptores EP<sub>3</sub> nos neurônios hipotalâmicos, desencadeando a resposta febril. Adaptado de: EVANS, REPASKY e FISHER, 2015.

Na presença de pirógenos exógenos ou endógenos há aumento do valor do ponto de equilíbrio termorregulatório. Com isso, o organismo ativa estratégias para alcançar sua nova temperatura de referência. A elevação da temperatura corporal ocorre por aumento na taxa de produção de calor (termogênese com e/ou sem tremor) e ativação da retenção de calor (ROTH; BLATTEIS, 2014).

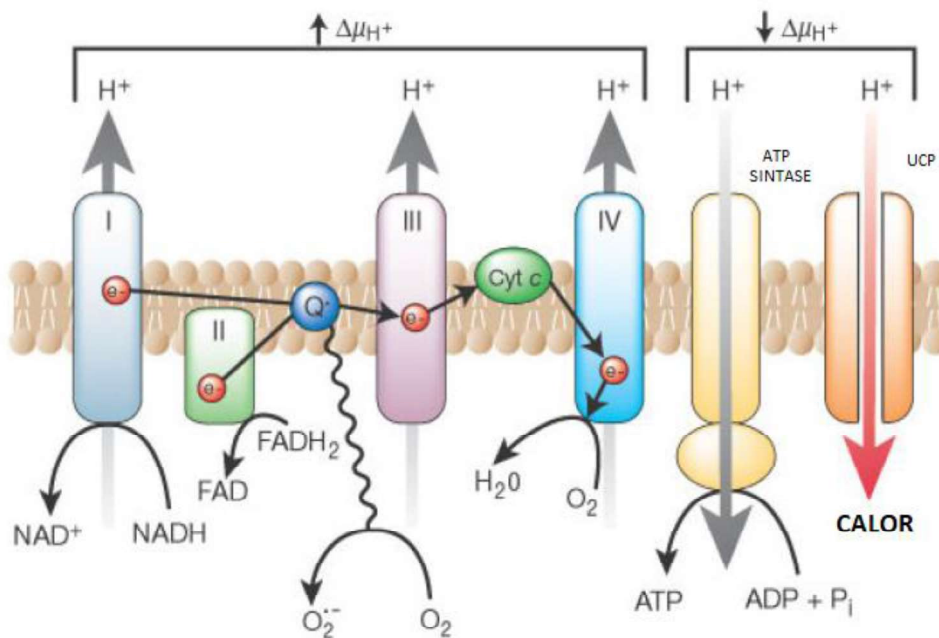
### 2.2.1. Mecanismos de produção e retenção de calor

Após ação da PGE<sub>2</sub> nos receptores EP<sub>3</sub> no hipotálamo, há manutenção da resposta febril por efeitores termorreguladores. Os principais são os vasos sanguíneos

(vasoconstrição para controle da perda de calor), músculos esqueléticos (termogênese por tremor) e o TAM (termogênese independente de tremores).

O processo de termogênese sem tremores acontece no TAM, órgão especializado para a geração de calor, e contribui para a manutenção da temperatura corporal (TANSEY; JOHNSON, 2015). A termogênese ocorre como consequência da incapacidade de geração de ATP mitocondrial e de sua utilização (MORRISON, 2016b). O TAM é um tecido rico em mitocôndrias, que, especificamente, possuem grande quantidade de proteína desacopladora 1 (UCP-1), que permitem a geração de calor por dissociação da energia resultante da cadeia transportadora de elétrons (CTE) para formação de ATP (TUPONE; MADDEN; MORRISON, 2014).

A energia obtida da transferência de elétrons pela cadeia transportadora é conservada em um gradiente eletroquímico de prótons no espaço intermembranar mitocondrial. Essa energia impulsiona a produção de ATP. Contudo, na presença de um desacoplador, como a UCP-1, o gradiente de concentração é desfeito (vazamento de prótons), gerando calor e inibindo a síntese de ATP, favorecendo a formação de ERO (Figura 2). (BERRY et al., 2018; MENGA et al., 2018).



**Figura 2:** Geração de calor por dissociação da energia mitocondrial. A energia conservada no gradiente eletroquímico impulsiona a síntese de ATP pela ATP-sintase. Nas mitocôndrias do TAM, a UCP-1 converte a energia obtida da cadeia transportadora de elétrons em calor. Com a diminuição do gradiente de prótons, a ATP-sintase se desacopla, diminuindo a produção de ATP. Adaptado de: ARDEN e RAMSEY, 2015.

O TAM possui receptores  $\beta_3$  adrenérgicos que são ativados após interação com as catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina). Após a indução da resposta febril há aumento da liberação de noradrenalina, que interagindo com os receptores do TAM irá aumentar a ativação da UCP-1, elevando a temperatura corporal na febre (TANSEY; JOHNSON, 2015).

Em situações fisiológicas normais, neurônios da APOHA regulam de forma inibitória a ativação do TAM. Na febre, quando há ligações de  $PGE_2$  em seu receptor  $EP_3$  no hipotálamo, neurônios sensíveis ao calor são inibidos. Assim, com a inibição dos neurônios que impedem a atividade do TAM, dar-se-á início ao processo de termogênese (TUPONE; MADDEN; MORRISON, 2014).

### 2.2.2. Febre experimental com uso de pirógenos exógenos

No modelo de febre experimental, a febre pode ser induzida com a administração de PAMP exógenos. O principal pirógeno utilizado é o LPS, componente da membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas. Grande número de estudos de febre utiliza esse modelo (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; RUMMEL, 2016).

O LPS é reconhecido por receptores TLR-4, presentes em células imunitárias (macrófagos, células dendríticas, micróglia). Os receptores TLR são proteínas transmembranares, em que a porção extracelular reconhece o PAMP e a porção intracelular ativa cascatas de transdução de sinal (ROTH; BLATTEIS, 2014). A ativação desse receptor resulta na liberação de citocinas inflamatórias que atuarão na APOHA aumentando a expressão de COX-2 e conseqüentemente a produção de  $PGE_2$  (ZAMPRONIO; SOARES; SOUZA, 2015). Dados apontam que a resposta inflamatória provocada pelo LPS também regula o metabolismo celular (KABAT; PEARCE, 2017).

### 2.2.3. Perfil metabólico durante a febre

A estimulação imunológica induzida pela febre acompanha alterações metabólicas com reprogramação mitocondrial (MENGA et al., 2018). Durante estado inflamatório ou infeccioso, a sinalização inata provocada pelos PAMP induz mudanças

no fluxo metabólico, no equilíbrio redox e na abundância de metabólitos (SANCHO; ENAMORADO; GARAUDE, 2017).

As mitocôndrias são organelas celulares de membrana dupla (externa e interna) que são responsáveis em fornecer energia à célula em forma de ATP pela fosforilação oxidativa, manutenção do estado redox (produção de ERO), conduzir a termogênese e controlar a morte celular por apoptose (HILL; SATARANATARAJAN; VAN REMMEN, 2018; TRIPODI et al., 2018). Tendo em vista tamanha importância da função mitocondrial na manutenção da homeostase, estudos demonstram que células com mitocôndrias disfuncionais são incapazes de gerar ATP suficiente a partir da fosforilação oxidativa, e então buscam alternativas, como aumento da glicólise, para suprir a demanda energética (LI et al., 2017).

Estudos recentes identificaram que, após estresse térmico, houve diminuição da fosforilação oxidativa (diminuição da produção de ATP), além do aumento da glicólise e formação de ERO (MENGA et al., 2018; NAPA et al., 2017). A glicólise aeróbica serve de estratégia porque fornece rápida produção de ATP. O dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e o piruvato, produzidos pela glicólise, são estimuladores essenciais do ciclo do ácido cítrico, que compreende a conversão de carboidratos, proteínas e lipídios em compostos de alta energia como o NADH e o dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH<sub>2</sub>) (DJAFARZADEH; JAKOB, 2017; MENGA et al., 2018; MILLS; KELLY; O'NEILL, 2017).

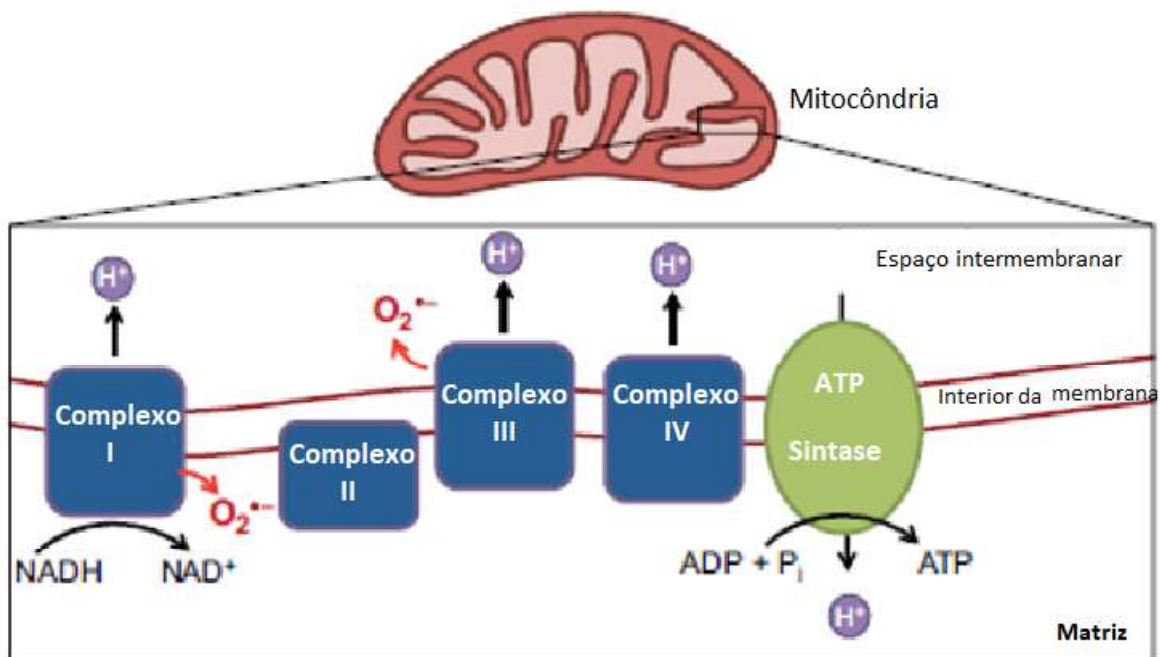
Na célula, a principal fonte de ATP é a fosforilação oxidativa mitocondrial, que por meio da CTE realiza a transferência de elétrons de substratos reduzidos (NADH e FADH<sub>2</sub>) para o oxigênio molecular (DIAS et al., 2018). A CTE, localizada na membrana mitocondrial interna, é formada por quatro complexos enzimáticos responsáveis pela transferência de elétrons (complexos de I a IV), dois transportadores de elétrons (ubiquinona/coenzima Q e citocromo C) e o sistema de fosforilação (ATP-sintase ou complexo V) (SANCHO; ENAMORADO; GARAUDE, 2017; SCHÖPF et al., 2016).

A passagem de elétrons do complexo I ao IV é associada ao fluxo de prótons que fluem da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, resultando na geração de um gradiente eletroquímico (força próton-motriz) ao longo da membrana interna mitocondrial (DJAFARZADEH; JAKOB, 2017). Quando a força próton-motriz é alta, o funcionamento da CTE ocorre de forma mais lenta conforme o bombeamento de prótons necessita de maior força eletroquímica (BERRY et al., 2018). A força próton-motriz é necessária para a síntese de ATP, pois a ATP-sintase transporta íons

de hidrogênio de volta à matriz mitocondrial associada à geração de ATP (DJAFARZADEH; JAKOB, 2017).

Entretanto, pequenos desequilíbrios metabólicos podem gerar diferenças significativas no sistema mitocondrial (PESTA; GNAIGER, 2012). No desacoplamento mitocondrial há vazamento de prótons e dissipação do gradiente, o que impossibilita a ação da ATP-sintase (fosforilação oxidativa) e favorece a produção de calor e formação de ERO (BERRY et al., 2018). Ou seja, sem o gradiente eletroquímico, há inibição da fosforilação oxidativa mesmo com o bom funcionamento da CTE (SANCHO; ENAMORADO; GARAUDE, 2017). O resultado da diminuição da fosforilação oxidativa é o aumento da glicólise a fim de compensar a falha energética, com consequente estímulo da CTE (KABAT; PEARCE, 2017). A maior atividade da CTE pode aumentar a probabilidade de produção de ERO, por haver aumento na quantidade de elétrons fluindo pelos complexos (BERRY et al., 2018).

A produção de ERO mitocondrial acontece principalmente nos complexos I e III da CTE (BERRY et al., 2018; FIGUEIRA et al., 2013) e pode ter papel protetor durante a inflamação (MILLS; KELLY; O'NEILL, 2017). Entretanto, quando a produção de ERO (principalmente ânions superóxido e peróxido de hidrogênio) é maior que sua eliminação por sistemas antioxidantes endógenos, ocorre o estresse oxidativo, causador de dano celular (**Figura 3**) (BIGARELLA; LIANG; GHAFARI, 2014).



**Figura 3:** Cadeia transportadora de elétrons e ATP-sintase. Formação do gradiente eletroquímico e ERO a partir da CTE. Adaptado de: BIGARELLA; LIANG; GHAFARI, 2014.

Pesquisas demonstram a relação entre a produção de ERO mitocondrial e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (NAIK; DIXIT, 2011). Foi analisado que, após inibição da produção de ERO houve diminuição da liberação de fatores pró-inflamatórios (MENGA et al., 2018). Ainda, nosso grupo demonstrou recentemente que durante a febre induzida por LPS há aumento de ERO no hipotálamo, TAM e fígado de ratos, sugerindo papel inflamatório durante estresse oxidativo (GOMES et al., 2018). Igualmente, um estudo recente relatou que a estimulação celular com LPS resultou em aumento significativo na respiração mitocondrial, reduzindo a produção de ATP e aumentando a geração de ERO (NAPA et al., 2017).

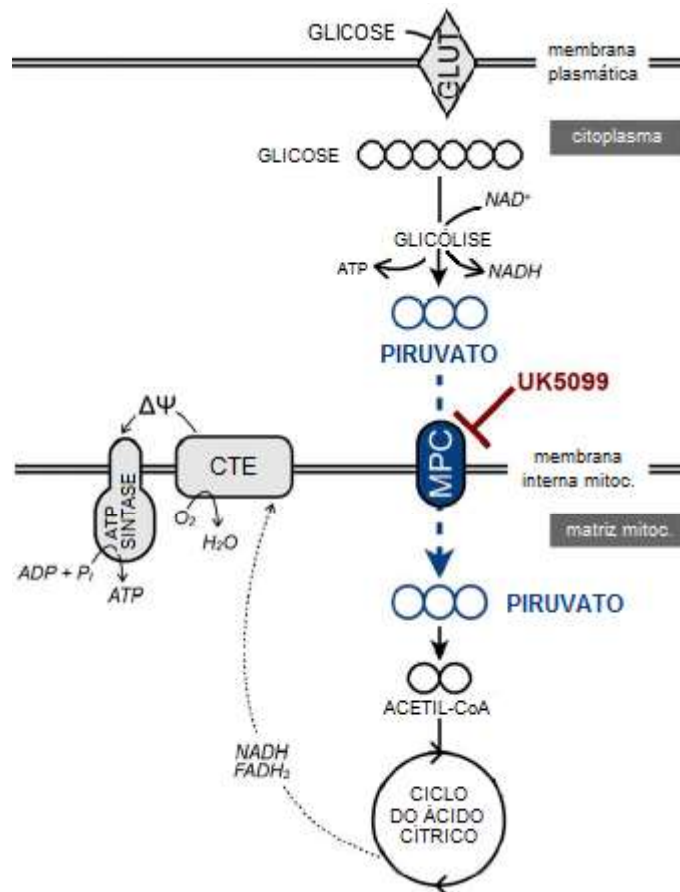
### 2.3. Carreador de piruvato mitocondrial 1 (MPC-1)

Como discutido anteriormente, o aumento da temperatura ocasiona diminuição da fosforilação oxidativa e consequente aumento da glicólise para fornecimento de energia, que pode ocorrer por disfunção mitocondrial (MENGA et al., 2018; ZHONG et al., 2015). Esse processo de quebra da molécula de glicose, glicólise, tem como produto final a formação de ATP e piruvato, principal insumo do ciclo do ácido cítrico (GRAY; TOMPKINS; TAYLOR, 2014). Sendo assim, o aumento da glicólise gera, consequentemente, maiores quantidades de piruvato. Com o aumento da oferta de substrato há aumento na taxa de respiração mitocondrial, o que retarda o fluxo da CTE (por saturação), possibilitando o escape de elétrons e posterior formação de ERO.

Estudo recente realizado por nosso grupo identificou aumento na expressão do transportador de piruvato mitocondrial-1 (MPC-1) após estímulo com LPS, indicando a participação deste substrato na resposta febril e, possivelmente, na produção de ERO (FIRMINO et al., 2018).

A molécula de piruvato difunde-se livremente por poros não seletivos na membrana externa mitocondrial, mas por ser uma molécula carregada, requer um transportador específico para passar do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial, o complexo MPC (GRAY et al., 2015; QUANSAH et al., 2018). Após a entrada na matriz mitocondrial, o piruvato é oxidado em acetil-coA e posteriormente em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) mediante o ciclo do ácido cítrico. A energia criada por essa transformação produz os equivalentes redutores NADH e FADH<sub>2</sub>, necessários

para a geração da força próton-motriz e produção de ATP na CTE (GRAY; TOMPKINS; TAYLOR, 2014; MCCOMMIS; FINCK, 2016). Por esse motivo, o piruvato é considerado responsável por conectar a via glicolítica ao ciclo do ácido cítrico, sendo um componente importante da fosforilação oxidativa (ZHONG et al., 2015) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Entrada do piruvato na matriz mitocondrial. A quebra da molécula de glicose no citoplasma resulta na formação de piruvato, ATP e NADH. Com o auxílio da MPC, o piruvato é capaz de entrar na matriz mitocondrial para ser oxidado em acetil-coA e participar do ciclo do ácido cítrico. Esse processo gera NADH e FADH<sub>2</sub>, substratos para a cadeia transportadora de elétrons, necessários para a fosforilação oxidativa e produção de ATP. O inibidor de MPC, UK-5099, inibe o transporte de piruvato para a matriz mitocondrial. GLUT, transportador de glicose; MPC, carreador de piruvato mitocondrial; CTE, cadeia transportadora de elétrons. Adaptado de: DIVAKARUNI, A. S. et al, 2017.

O inibidor padrão ouro do transporte de piruvato mitocondrial é o UK-5099 (MCCOMMIS; FINCK, 2016). Estudos analisando o efeito do UK-5099 o definem como potente inibidor específico de MPC, capaz de diminuir o transporte de piruvato por causar modificações estruturais na proteína transportadora (CORBET, 2018).

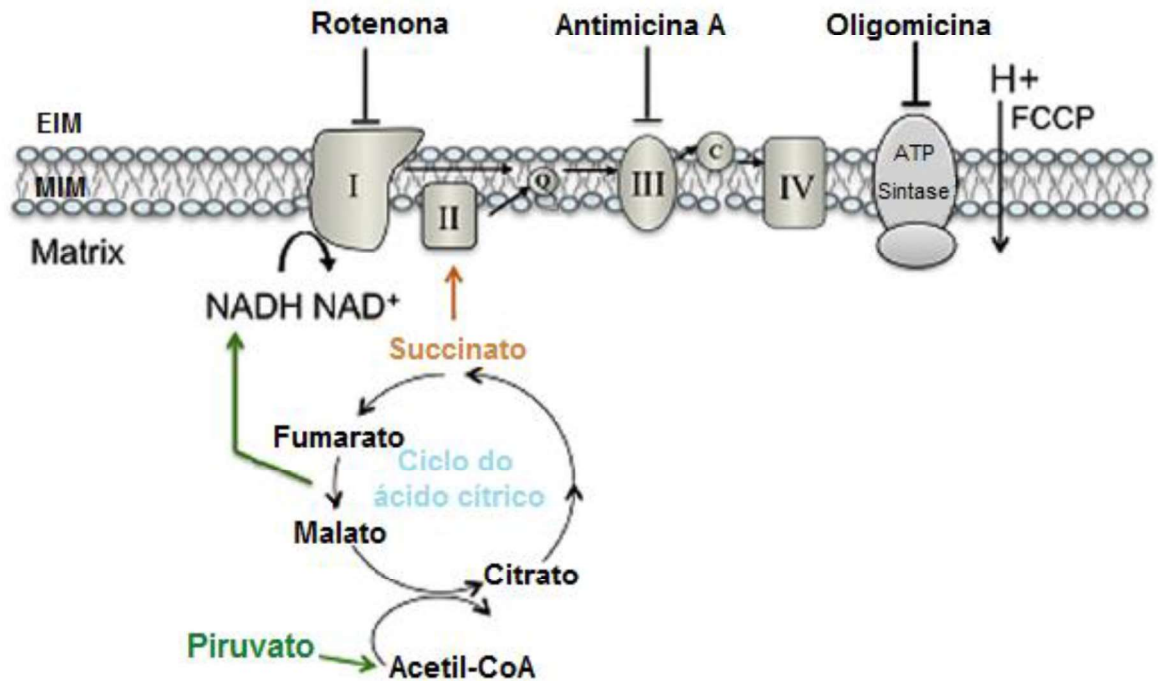


Pesquisas recentes apontam que o tratamento de células com o UK-5099 diminui a concentração de piruvato nas mitocôndrias, atenua a fosforilação oxidativa mitocondrial e reduz a produção de ATP e o potencial de membrana (ZHONG et al., 2015; ZOU et al., 2019), sem causar a morte celular (DIVAKARUNI et al., 2017).

#### 2.4. Respirometria de alta resolução

A análise respirométrica fornece diversas informações relacionadas ao funcionamento mitocondrial, entre elas, atividades enzimáticas mitocondriais (incluindo ciclo do ácido cítrico), dos complexos respiratórios, transferência de elétrons e geração de ATP (SCHÖPF et al., 2016). A respirometria de alta resolução possibilita medições com alta precisão, resolução e sensibilidade do consumo de oxigênio mitocondrial viabilizando o registro instantâneo das taxas de consumo de O<sub>2</sub> (DIAS et al., 2018; DJAFARZADEH; JAKOB, 2017). A técnica tem por princípio o acompanhamento da concentração de oxigênio associado ao consumo metabólico (fluxo de oxigênio) pela amostra ao longo do tempo (PESTA; GNAIGER, 2012).

A avaliação dos complexos mitocondriais se dá por meio da adição de substratos (piruvato, malato, succinato, glutamato, ADP e outros), inibidores (rotenona, antimicina A e oligomicina) e desacopladores, como o carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenil-hidrazona (FCCP), que são metabolizados na mitocôndria (ZEIDLER et al., 2017) (**Figura 5**). A combinação de substratos fisiológicos se faz necessária para a reconstituição parcial das funções do ciclo do ácido cítrico e entrada de elétrons na CTE (MAKRECKA-KUKA; KRUMSCHNABEL; GNAIGER, 2015). Dessa forma é possível realizar análise da capacidade respiratória e funcionamento mitocondrial.



**Figura 5:** Reconstituição da atividade mitocondrial. A adição de substratos (piruvato, malato, succinato, ADP e outros) fornece elétrons para os complexos mitocondriais estabelecerem o gradiente eletroquímico. Os inibidores específicos (rotenona, antimicina A e oligomicina) inibem essa passagem. Na presença de um desacoplador (FCCP), há vazamento de prótons para a matriz, desfazendo a força próton-motriz necessária para a produção de ATP. EIM, espaço intermembranar; MM, membrana mitocondrial interna. Adaptado de: WALHEIM; WIŚNIEWSKI; JASTROCH, 2018.

A proposta deste trabalho foi, então, analisar a participação da MPC-1 na resposta febril *in vivo* utilizando o inibidor UK-5099 e verificar possíveis alterações na resposta mitocondrial com o estímulo febril pela técnica de respirometria de alta resolução. Com a inibição do transporte, espera-se redução da atividade da CTE e consequente diminuição de ERO, resultando em inibição da resposta febril.

### 3. JUSTIFICATIVA

Estudos recentes demonstraram, a partir de análise proteômica do tecido hipotalâmico, que durante a febre induzida por LPS, juntamente com a ativação de vias inflamatórias, ocorrem modificações no perfil metabólico celular, especialmente na quantidade de proteínas associadas à glicólise e ao ciclo do ácido cítrico (FIRMINO et al., 2018).

Uma das proteínas identificadas como potencial alvo terapêutico foi a MPC-1. Essa proteína foi selecionada para o presente estudo por ser encontrada na membrana mitocondrial, por apresentar aumento na abundância (*fold change*  $\geq 1.5$ ) após administração de LPS, por não ter participação na febre descrita na literatura e pelo fato de existir inibidor específico (UK-5099) comercialmente disponível, que permite fazer a validação farmacológica.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

- Investigar como alterações metabólicas mitocondriais contribuem para a gênese e manutenção da febre.

### 4.2. Objetivos específicos

- Realizar análise funcional com utilização de inibidor específico em condições febris a fim de explorar o envolvimento do transportador na febre;
- Verificar alterações no perfil metabólico em ratos febris por avaliação respirométrica.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos e fêmeas, pesando entre 180 e 200 g, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de  $27 \pm 1$  °C, sob um ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso a ração e água. Os protocolos para uso de animais foram aprovados pela CEUA da UnB (Protocolo 99/2017) (**anexo I**).

## 5.2. Cirurgia para implante de cânula intracerebroventricular (icv)

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 ratos foram anestesiados com cetamina (60 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal. Em seguida, colocados em aparelho estereotáxico e imobilizados. Após imobilização, receberam injeção local subcutânea de lidocaína 2% e fenilefrina 0,04%. Seguindo protocolo padrão, o bregma foi localizado como ponto de referência para posicionamento da cânula e seguida perfuração do crânio para sua implantação. Os seguintes parâmetros estereotáxicos foram utilizados para a perfuração do crânio para a implantação da cânula icv: -1,5 mm ântero-posterior e -1,6 mm lateralmente ao bregma, sendo a inclinação da barra incisal de -2,5 mm.

As cânulas então foram colocadas no tecido cerebral dos animais, com coordenada ventral de -2,5 mm abaixo da superfície craniana. 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.

## 5.3. Cirurgia para implante de transmissores

Sob efeito anestésico da cirurgia icv, após a tricotomia e assepsia da pele, foi feita uma incisão de aproximadamente 2 cm na pele e músculos peritonais para inserir o transmissor, previamente lavado com solução salina estéril, na cavidade peritoneal. Em seguida, os músculos e a pele foram suturados separadamente

## 5.4. Mensuração da temperatura corporal dos ratos

O processo de aferição da temperatura corporal foi realizado por transmissores implantados na cavidade peritoneal, como já descrito. A temperatura corporal foi registrada em intervalos de 15 min, com início 1,5 h antes dos experimentos,

prossequindo até 5 horas após injeção de LPS. Os animais permaneceram na sala de experimentação, com temperatura controlada, por pelo menos 12 h antes do início dos experimentos. 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 de seis medições anteriores a qualquer tratamento. Em seguida, cada animal foi decapitado para a dissecação do hipotálamo.

### 5.5. Validação farmacológica

Os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos (veículo/salina, veículo/LPS, UK-5099/salina e UK-5099/LPS). Para investigar o efeito da inibição da MPC-1 com o UK-5099 sobre a temperatura de ratos, esta droga foi administrada por via intracerebroventricular (icv) na dose de  $1,0 \mu\text{g}/\text{rato}$ , diluída em tween 80 1% em salina. A dose do UK-5099 foi baseada em estudos pilotos realizados por nosso grupo.

Após 30 minutos do tratamento, os animais receberam injeção intravenosa de LPS ( $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou seu veículo (salina 0,9%,  $2 \text{ mL}/\text{kg}$ ). As temperaturas corporais foram aferidas durante 5 horas. Em seguida, os animais foram decapitados para a dissecação do hipotálamo e os transmissores retirados da cavidade peritoneal para posterior leitura.

### 5.6. Respirometria de alta resolução

Uma semana antes do experimento de oximetria, foi realizada a cirurgia para implante dos transmissores e mensuração da temperatura corporal como descrito no item 5.3. e 5.4.

A eutanásia dos animais foi realizada após 2,5 h da injeção intravenosa de LPS ou de seu veículo, momento de identificação do primeiro pico febril. Foi feita dissecação do hipotálamo seguida de homogeneização em tampão de sacarose (sacarose 0,32 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, tris-HCl 10 mM, pH 7,4) resfriado. Para que não houvesse lesão mitocondrial, a homogeneização foi feita gentilmente em homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem. Todo o procedimento foi realizado no gelo. Uma alíquota de cada homogenato foi retirada para quantificação de proteínas. A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o kit *Qubit® protein assay*.

A respiração mitocondrial foi estimada por respirometria de alta resolução com o instrumento *Oxygraph-2k* (*Oroboros Instruments*, Innsbruck, Áustria). A calibração foi realizada com 2 mL de tampão respiração alto potássio (KCl 100 mM, manitol 75 mM, sacarose 25 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM, EDTA 0,05 mM, tris-HCl 10 mM, pH 7,4) saturado com o ar e temperatura controlada em 37 °C. O equipamento possui duas câmaras distintas e, em cada uma delas foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de cada amostra (salina e LPS) para análise simultânea da atividade mitocondrial. A concentração e o fluxo de oxigênio foram monitorados e registrados em tempo real com o auxílio do software DatLab 5.1 (*Oroboros instruments*), seguida de correção gráfica pela concentração de proteínas de cada amostra (KARLSSON et al., 2016).

Para análise da respiração mitocondrial foi utilizado o protocolo SUIT (titulação de substratos-desacopladores-inibidores), em que é feita adição de componentes exógenos à câmara de registro (DIAS et al., 2018). Com a utilização de substratos e inibidores específicos é possível realizar análise das funções respiratórias e o fluxo de elétrons dos complexos I e II para a ubiquinona (KARLSSON et al., 2016). A adição de substratos, desacopladores e inibidores foi feita concomitantemente nas duas câmaras.

Na primeira análise do fluxo de oxigênio, para avaliação do estado geral da respiração mitocondrial, foi feita adição de: piruvato (5 mM), malato (2,5 mM), succinato (10 mM), ADP (500  $\mu\text{M}$ ), oligomicina (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ), FCCP (0,05  $\mu\text{M}$ ), rotenona (0,5  $\mu\text{M}$ ) e antimicina A (1  $\mu\text{M}$ ). Na segunda, para observar a influência do inibidor de MPC-1, UK-5099, no fluxo energético, foi adicionado: piruvato (5 mM), malato (2,5 mM), ADP (500  $\mu\text{M}$ ), UK-5099 (1  $\mu\text{M}$ ) e succinato (10 mM).

#### 5.6.1. Análise de dados

Os substratos do complexo I utilizados foram o piruvato 5 mM e malato 2,5 mM (substratos geradores de NADH). A adição de succinato 10 mM ativou a cadeia convergente, fornecendo  $\text{FADH}_2$  ao complexo II. Assim, o estado respiratório dependente da ATP-sintase (LEAK-CI e II) pôde ser estimado. A adição de ADP 500  $\mu\text{M}$  fornece o estado de capacidade de fosforilação oxidativa (FO), por ativar esse processo nas mitocôndrias (MAKRECKA-KUKA; KRUMSCHNABEL; GNAIGER, 2015).

A adição de oligomicina 0,1 µg/mL, inibidor da ATP-sintase, permitiu analisar a respiração mitocondrial independente da produção de ATP (LEAK-O). A respiração LEAK demonstra a respiração relacionada ao fluxo de elétrons pela CTE necessário para manter o potencial de membrana a fim de compensar o vazamento de prótons (KARLSSON et al., 2016).

A titulação com FCCP 0,05 µM, desacoplador mitocondrial, se fez com cautela para evitar inibição da respiração celular, até saturação de sua concentração. O FCCP desfaz o potencial de membrana e a força próton-motriz, permitindo analisar a capacidade respiratória máxima (CRM). Por fim, a adição de rotenona 0,5 µM e antimicina A 1 µM, inibidores do complexo I e III respectivamente, impede qualquer fluxo de elétrons na CTE, o que fornece uma taxa residual de consumo de oxigênio (ROX), ou seja, consumo de oxigênio não-mitocondrial (NAPA et al., 2017).

### 5.7. Análise estatística

Os dados da validação farmacológica foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). As comparações estatísticas foram feitas por ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0. O nível de significância a ser considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Porém, os dados obtidos através da respirometria de alta resolução são representativos, não gerando análise estatística.

## 6. RESULTADOS

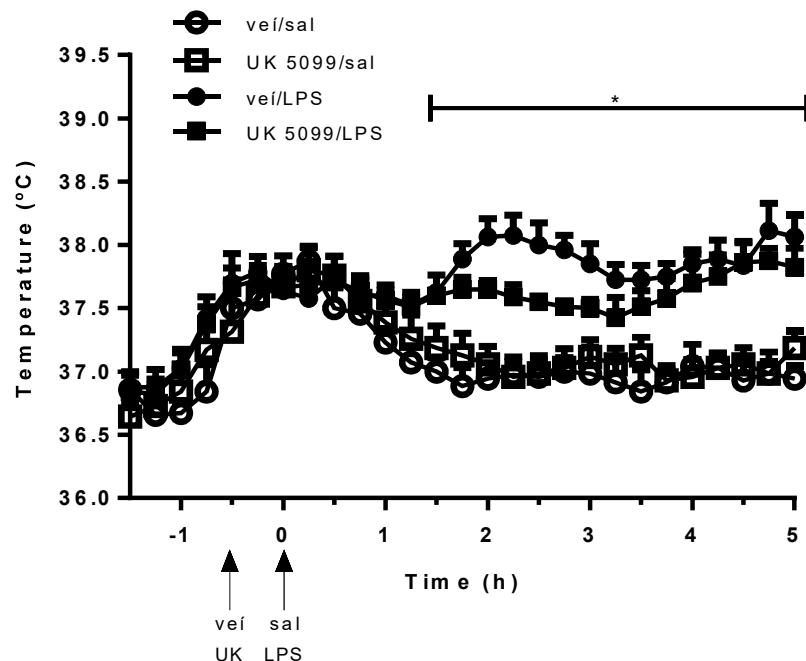
### 6.1. O tratamento com inibidor da MPC-1 (UK-5099) reduz a febre em ratos

Com o objetivo de analisar o envolvimento da MPC-1 na febre induzida por LPS foi administrado o UK-5099, inibidor do complexo MPC, na dose de 1,0 µg/rato (icv). Após 30 minutos do tratamento, os animais receberam injeção endovenosa de LPS (5 µg/kg) ou seu veículo (salina 0,9%, 2 mL/kg). A aferição da temperatura dos animais se deu a cada 15 minutos, registrados antes dos estímulos até 5 horas depois da administração de LPS.

Pode ser observado na **Figura 6** que os animais tratados com LPS apresentaram resposta febril padrão, com perfil bifásico. O aumento da temperatura

corporal registrada no momento das injeções se dá pelo estresse causado pela manipulação dos animais.

O pré-tratamento com UK-5099 na dose de 1,0  $\mu\text{g}/\text{rato}$  reduziu significativamente a febre induzida pelo LPS, com maior redução na primeira fase febril ( $\approx 2,5$  h). Por fim, o tratamento com os dois controles negativo, veí/sal e UK-5099/sal, não causou alteração significativa da temperatura dos animais, atestando adequação da dose do inibidor.



**Figura 6:** Efeito do inibidor da MPC-1 (UK-5099) sobre a resposta febril induzida por LPS. O UK-5099 foi administrado na dose de 1  $\mu\text{g}/\text{rato}$  (icv) 30 minutos antes da injeção intravenosa de LPS (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou seu veículo (salina 0,9%, 2 mL/kg). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da temperatura corporal (em  $^{\circ}\text{C}$ ) dos animais. Número de animais por grupo (n) = 5-7 animais/grupo. \*  $p < 0,05$  UK-5099/LPS quando comparado ao grupo veí/LPS.

## 6.2. Atividade diferencial em mitocôndrias hipotalâmicas após administração de LPS

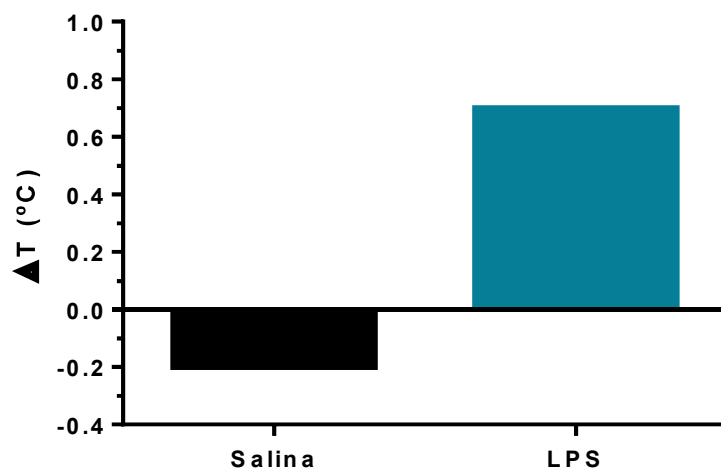
A fim de verificar a atividade mitocondrial após estímulo febril, foi realizada respirometria de alta resolução com utilização do sistema *Oxygraph-2k*. Os animais receberam injeção intravenosa de LPS (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou seu veículo (salina 0,9%, 2 mL/kg) e foram eutanasiados 2,5 h após a administração de LPS. Esse tempo foi escolhido



por corresponder a primeira fase da resposta febril, momento em que também se identificou o aumento da abundância da MPC-1 em estudo de análise proteômica do hipotálamo na febre (FIRMINO et al., 2018).

Os hipotálamos foram dissecados e homogeneizados com tampão de sacarose, em homogeneizador Potter, para verificação da atividade mitocondrial comparativa e viabilidade do UK-5099. No oxímetro, a variação de oxigênio é corrigida pela quantidade de proteína do homogenato na cubeta. Dessa forma, uma alíquota de cada amostra foi retirada para a quantificação de proteína. Assim, após a quantificação, o fluxo de oxigênio foi corrigido com as concentrações exatas de proteínas de cada amostra. O homogenato do hipotálamo do animal que recebeu salina continha 26,6 mg/mL de proteínas, enquanto o homogenato do animal que recebeu LPS continha 25,3 mg/mL de proteínas.

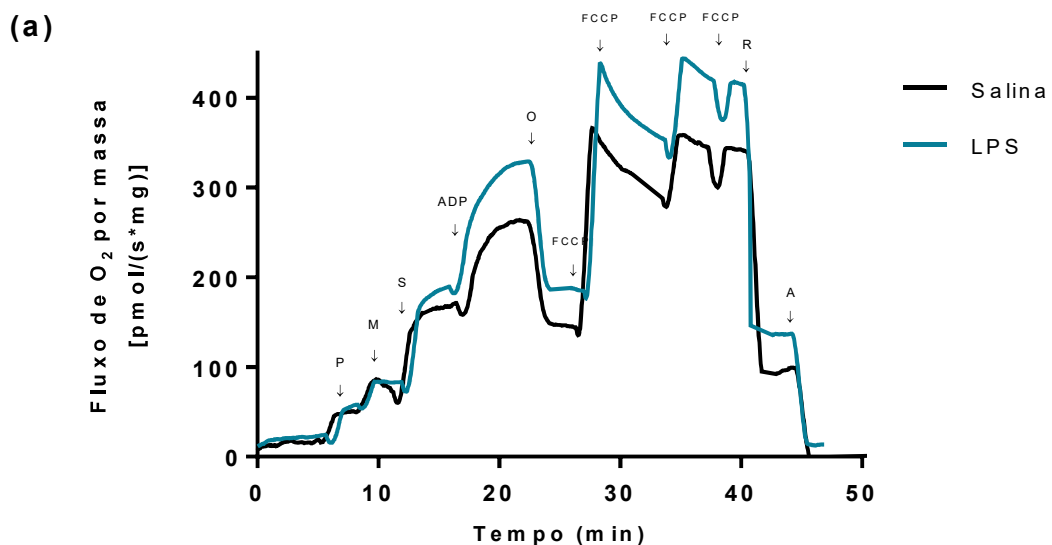
A variação da temperatura corporal dos animais foi registrada e calculada pela diferença entre a temperatura no momento da eutanásia (2,5 h após injeção de LPS) e a média da temperatura basal ( $\Delta T = T_{2,5h} - T_{basal}$  °C). A diferença na temperatura dos animais é apresentada na **Figura 7**, em que o animal que administrado com LPS apresentou temperatura corporal elevada, quando comparado com o animal que recebeu salina.

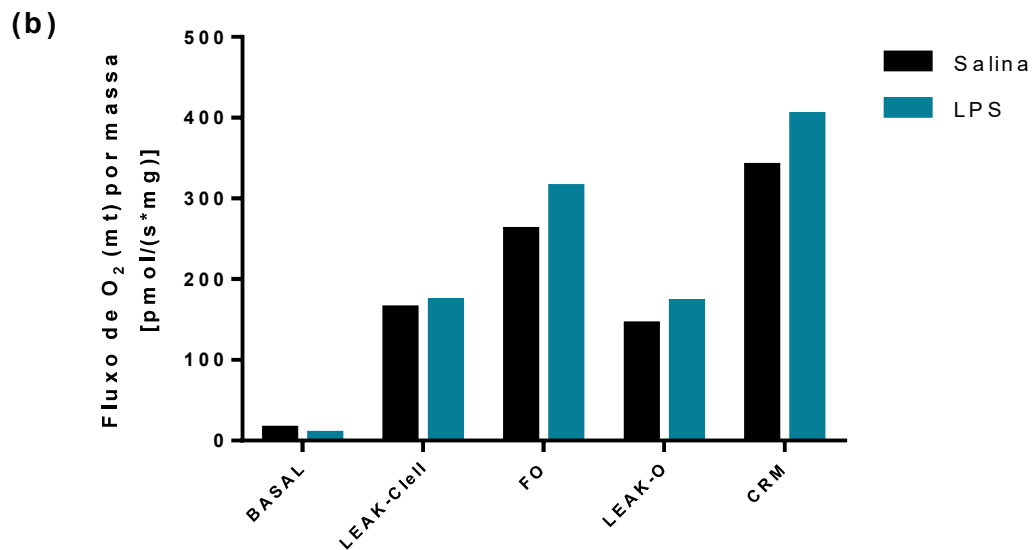


**Figura 7:** Variação da temperatura corporal dos animais após 2,5 h da administração intravenosa de LPS ou salina. A variação da temperatura corporal ( $\Delta T$ ) foi determinada pela diferença entre a temperatura 2,5 h após administração de LPS (5  $\mu$ g/Kg) ou salina (0,9%) e a média da temperatura basal do animal ( $\Delta T = T_{2,5h} - T_{basal}$  °C).

Foi realizada comparação do perfil respiratório entre homogenatos hipotalâmicos de ratos após estímulo com LPS e grupo controle. A utilização de protocolos SUIT, com titulações de substratos, inibidores e desacopladores, permitiu realizar uma análise geral do estado respiratório dos homogenatos. Como observado na **Figura 8a**, as mitocôndrias estimuladas com LPS apresentaram um padrão de resposta superior ao padrão apresentado das mitocôndrias do grupo controle, sugerindo maior atividade mitocondrial durante a febre.

Os substratos, inibidores e desacopladores foram adicionados em suas concentrações saturantes, permitindo a extração de dados de respiração basal, respiração relacionada ao fluxo de elétrons pela CTE para manter o potencial de membrana compensando o vazamento de prótons dependente (LEAK-CI e II) e independente (LEAK-O) da ATP-sintase, fosforilação oxidativa e a capacidade respiratória máxima. Todas as taxas foram corrigidas pela respiração residual (não mitocondrial), garantindo que todos os valores são referentes ao consumo de oxigênio mitocondrial. Sendo assim, é possível observar na **Figura 8b** que, a efeito comparativo, quase todas as taxas apresentam diferenças entre os grupos. Dentre elas, a fosforilação oxidativa e a capacidade respiratória máxima foram as atividades que mais demonstraram diferença após estímulo com LPS quando comparadas ao grupo controle.



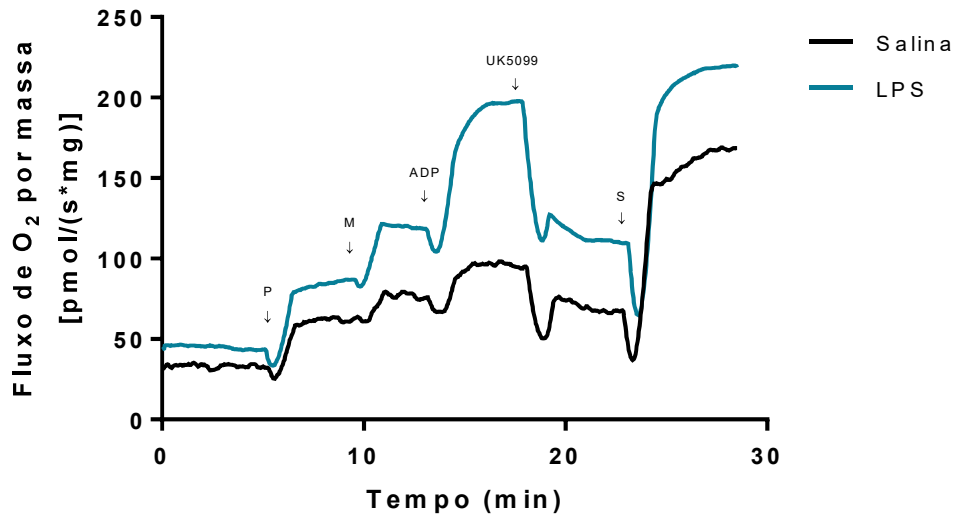


**Figura 8:** Avaliação da função mitocondrial após administração de LPS. **(a)** Análise representativa sugere que LPS provoca aumento da atividade mitocondrial. As setas indicam o momento da adição de cada substrato/droga: piruvato 5 mM (P), malato 2,5 mM (M), succinato 10 mM (S), ADP 500  $\mu$ M, oligomicina 0,1  $\mu$ g/mL (O), titulações de FCCP 0,05  $\mu$ M, rotenona 0,5  $\mu$ M (R) e antimicina A 1  $\mu$ M (A). **(b)** Atividade mitocondrial alterada após administração de LPS. A capacidade de fosforilação oxidativa (FO) e a capacidade respiratória máxima (CRM) estão aumentadas em mitocôndrias estimuladas com LPS. Respiração basal (BASAL), vazamento de prótons no estado fosforilante (LEAK-CI e II), capacidade de fosforilação oxidativa (FO), vazamento de prótons não-fosforilante (LEAK-O) capacidade respiratória máxima (CRM).

### 6.3. Efeito do UK-5099 sobre a atividade mitocondrial em mitocôndrias hipotalâmicas

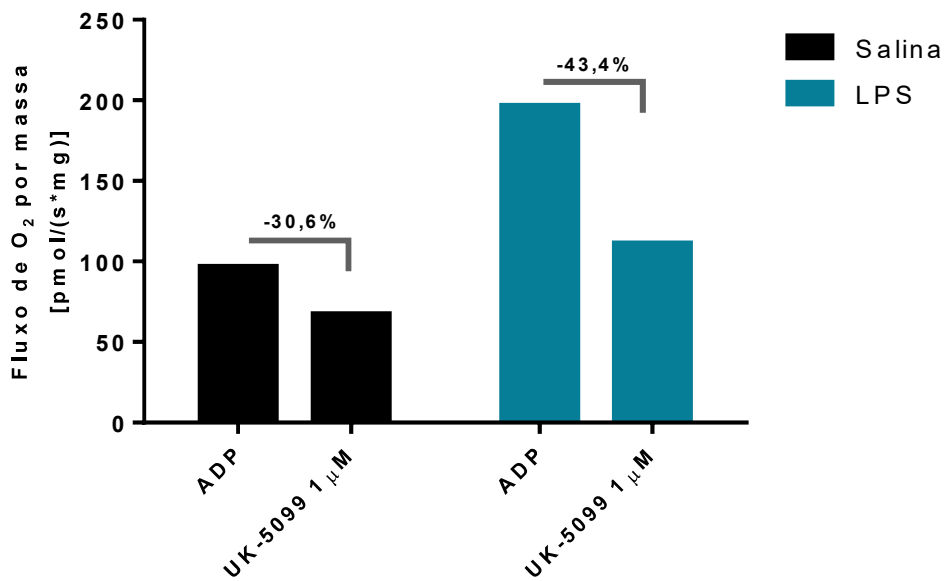
A fim de realizar análise da viabilidade e dos efeitos do UK-5099 em preparações mitocondriais, foi feita uma corrida respiratória com titulações de substratos do complexo I (piruvato e malato) seguido pelo ADP, a fim de observar a fosforilação oxidativa relativa ao complexo I. Com a adição de UK-5099 1  $\mu$ M, a inibição da CTE pôde ser notada (**Figura 9**). Em seguida, para verificar se esta inibição ocorreu por inibição apenas do complexo I, foi adicionado succinato, substrato do complexo II. Como pode ser observado na figura, a adição do succinato promoveu aumento do fluxo de oxigênio em ambos os grupos, sugerindo especificidade de inibição do UK-5099 ao carreador de piruvato, primordial na alimentação do complexo I, além de demonstrar que a dose utilizada não inibiu a atividade respiratória total, uma

vez que as mitocôndrias foram capazes de reestabelecer seu fluxo normal à partir do complexo II.



**Figura 9:** Efeito do inibidor de MPC-1 (UK-5099) sobre a atividade mitocondrial. Após a adição de piruvato 5 mM (P), malato 2,5 mM (M) e ADP 500  $\mu$ M, o UK-5099 1  $\mu$ M diminui o fluxo de oxigênio na CTE. A volta da respiração com a adição de succinato 10 mM (S), substrato do complexo II, representa a viabilidade e inibição específica do UK-5099.

Por fim, fez-se análise representativa da capacidade inibitória do UK-5099 em cada grupo. Considerando o momento de maior taxa respiratória após a adição do ADP e o de menor fluxo após a adição do inibidor, foi possível elaborar um gráfico de inibição comparativa do UK-5099. Na **Figura 10** constata-se que o UK-5099 reduziu em 43,4% a atividade de mitocôndrias tratadas com LPS, enquanto apresentou redução de 30,6% da atividade mitocondrial do grupo controle.



**Figura 10:** Atividade inibitória do UK-5099 em mitocôndrias de animais tratados com LPS. Gráfico representativo demonstrando redução no fluxo de oxigênio após administração de UK-5099 1 µM em mitocôndrias de animais estimulados com LPS (5 µg/kg) ou salina (0,9%).

## 7. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo forneceram uma visão ampla do funcionamento mitocondrial durante a febre induzida por LPS. A febre é um sintoma comum nas doenças inflamatórias e infecciosas, ocasionado por uma série de respostas imunes, como a vasoconstrição, aumento da sudorese, termogênese relacionada ou não a tremores (BLOMQVIST; ENGBLOM, 2018). Por se tratar de uma resposta imune, a febre pode ser considerada benéfica, já que o aumento da temperatura atrapalha a replicação de microrganismos (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015). Entretanto, o aumento prolongado da temperatura se torna prejudicial, principalmente em casos de inflamação extrema, sendo capaz de diminuir a sobrevivência do paciente (HARDEN et al., 2015).

O controle da temperatura corporal ocorre pela integração de diversos sistemas, tendo o hipotálamo como coordenador central (TANSEY; JOHNSON, 2015). Os neurônios hipotalâmicos detectam mudanças sutis da temperatura sanguínea e, a partir disso, desencadeiam respostas termorreguladoras para manter a homeostase corporal (BARTFAI; CONTI, 2010). Dessa forma, tendo em vista a importância do

hipotálamo no controle da temperatura corporal, os experimentos e análises foram realizados com foco no estudo da região hipotalâmica.

O modelo de febre experimental seguido neste estudo foi com a indução da febre através do uso do LPS como pirógeno exógeno. Na literatura esse modelo já têm sido relatado como eficaz estimulador da resposta febril (EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; FIRMINO et al., 2018; GOMES et al., 2018; RUMMEL, 2016). A dose de LPS utilizada foi capaz de gerar uma resposta moderada nos animais, com aumento bifásico da temperatura, característico da febre (ROTH; BLATTEIS, 2014).

A MPC-1, proteína de interesse deste estudo, é uma proteína de membrana interna da mitocôndria responsável por importar piruvato do meio intersticial para a matriz mitocondrial (QUANSAH et al., 2018). Estudos recentes demonstraram que o bloqueio do transporte de piruvato por deleção (LI et al., 2017) ou inibição (QUANSAH et al., 2018) da MPC-1, influenciou o metabolismo celular, sugerindo, respectivamente, diminuição da resposta inflamatória e promoção de neuroproteção. Ainda, camundongos com deleção parcial de MPC-1 apresentaram alterações clínicas relevantes, como menos acúmulo do tecido adiposo e diminuição da temperatura corporal periférica (ZOU et al., 2018). Pouco se sabe sobre o envolvimento dessa proteína de transporte na manutenção da febre, o que indica um novo alvo para estudo.

Para analisar a participação da MPC-1 na resposta febril *in vivo*, foi utilizado um inibidor específico, o UK-5099. A pré-administração de UK-5099 reduziu significativamente a resposta febril induzida por LPS. Observou-se maior redução de temperatura na primeira fase febril, o que pode sugerir maior participação da MPC-1 neste primeiro momento. Em concordância, o aumento na abundância da MPC-1 detectado na análise proteômica do hipotálamo também foi realizado 2,5 h após a administração de LPS. Sendo assim, o tempo escolhido para análise mitocondrial foi o de 2,5 h após o estímulo pirogênico.

Após a confirmação do envolvimento da MPC-1 na resposta febril, sentiu-se necessidade de compreender o funcionamento mitocondrial nesse quadro clínico. Poucos são os estudos que associam a febre com a reprogramação mitocondrial. Assim, com a utilização de respirometria de alta resolução, foi comparado o fluxo de oxigênio de homogenatos hipotalâmicos de animais tratados com LPS ou com salina. O fluxo de oxigênio é gerado através do consumo de oxigênio pela quantidade da amostra, por meio do oxímetro.

Uma grande vantagem deste método é a capacidade de detectar mudanças sutis em toda a CTE, o que fornece uma análise profunda das funções oxidativas da mitocôndria. Isto permite que haja distinção de alterações em complexos específicos ou em toda a unidade mitocondrial (BURTSCHER et al., 2015). Neste estudo foi demonstrado, de maneira representativa, o funcionamento mitocondrial após estímulo pirogênico com LPS. Taxas de respiração basal, respiração relacionada ao vazamento de prótons para manter a força próton-motriz, fosforilação oxidativa e a capacidade respiratória máxima foram identificados e comparados entre os dois grupos. A identificação destes diferentes estados respiratórios permite um estudo específico do local em que a respiração mitocondrial está sendo afetada.

Em uma primeira análise já é possível identificar maior atividade mitocondrial após estímulo febril. As mitocôndrias de animais que receberam tratamento com LPS apresentaram perfil de resposta aos substratos de forma semelhante ao grupo controle, porém com um fluxo de oxigênio significativamente maior. Isto sugere que após estímulo febril há maior taxa de funcionamento mitocondrial.

De maneira geral, dentre os parâmetros analisados, as mitocôndrias de animais administrados com LPS apresentaram fluxo metabólico maior em todos, exceto pela respiração basal. A diminuição da respiração basal pelas mitocôndrias com LPS pode se dar devido à maior taxa de respiração residual apresentada por este grupo, o que sugere aumento de mitocôndrias disfuncionais. A principal diferença entre os grupos se dá pelo aumento da fosforilação oxidativa e capacidade respiratória máxima nas mitocôndrias tratadas com LPS.

O aumento da fosforilação oxidativa indica maior atividade mitocondrial para geração de energia (ATP) através da oxidação completa da glicose a  $\text{CO}_2$  (DIAS et al., 2018). Entretanto, essa resposta pode ser adaptada devido ao estímulo pirogênico, ocasionado por deficiência fosforilativa. Estudos relatam que células tratadas com LPS apresentaram valores fosforilativos elevados, porém com redução na produção de ATP (NAPA et al., 2017).

O aumento da capacidade respiratória máxima identificado pelo grupo que recebeu tratamento com LPS indica que, além das mitocôndrias estarem mais ativas, há maior fluxo de elétrons na CTE, o que pode acontecer por consequência da maior concentração de piruvato na matriz, gerando mais NADH e, conseqüentemente, maior funcionamento da CTE. A atividade elevada da CTE associada à disfunção

mitocondrial reflete em maior deslizamento e escape de elétrons para a formação de ERO mitocondrial (BERRY et al., 2018).

Estudos previamente realizados declararam que, após o estímulo com LPS, as mitocôndrias apresentaram maior consumo de oxigênio relacionado à diminuição da produção de ATP e aumento da geração de ERO (MENGA et al., 2018; NAPA et al., 2017). Nosso laboratório realizou um estudo que identificou que, na febre induzida por LPS há aumento da formação de ERO no hipotálamo, TAM e fígado, associando o estresse oxidativo com a resposta febril (GOMES et al., 2018). Os resultados encontrados neste trabalho reforçam essa hipótese, já que o maior consumo de oxigênio e atividade da CTE podem ser indicadores de aumento da produção de ERO após tratamento com LPS, sugerindo aumento do estresse oxidativo na resposta febril.

Por fim, após identificação do envolvimento da MPC-1 na febre e análise da diferença mitocondrial na presença do LPS, foi feita análise do perfil de inibição do UK-5099 para verificar a seletividade ao piruvato (substrato do complexo 1) e sua viabilidade. A inibição da atividade mitocondrial após a adição de UK-5099 pôde ser restaurada após a adição de succinato, substrato do complexo II. Esse dado sugere que o UK-5099 funciona como potente inibidor da atividade mitocondrial, mas apenas do complexo I, já que com a adição de substratos do complexo II o funcionamento mitocondrial foi retomado. Esse dado propõe que as mitocôndrias continuam funcionais mesmo após a inibição seletiva de UK-5099, garantindo a viabilidade e especificidade deste inibidor. Esta análise confirma os resultados encontrados na literatura sobre o UK-5099, retratado como bloqueador do transporte de piruvato para a matriz da mitocôndria, capaz de reduzir a fosforilação oxidativa mitocondrial e consequente produção de ATP (MÁRQUEZ et al., 2019; ZHONG et al., 2015; ZOU et al., 2019).

É importante ressaltar que, para confirmar os dados obtidos na respirometria de alta resolução, é necessário realizar repetições das mesmas análises a fim de verificar se os resultados são realmente reprodutíveis e significativos.

Com estes dados foi possível estimar a proporção inibitória do UK-5099 entre homogenato mitocondrial hipotalâmico de animais que tiveram febre induzida com LPS e o grupo controle. Nas mesmas doses e condições o UK-5099 teve maior atividade inibitória nas mitocôndrias de animais que receberam LPS em comparação com o grupo controle. Sabe-se que o LPS induz aumento na expressão da MPC-1



hipotalâmica (FIRMINO et al., 2018). Dessa forma, como há maior quantidade de sítios de ligação, espera-se que ocorram mais interações fármaco:receptor, apesar de manter a mesma concentração do inibidor. Assim é plausível sugerir que o inibidor específico UK-5099 causou maior efeito inibitório no grupo LPS quando comparado à ausência de estímulo febril em decorrência do aumento na quantidade da proteína MPC-1, induzida pelo próprio estímulo com LPS.

## 8. CONCLUSÃO

Neste trabalho, os resultados sugerem que a MPC-1 está envolvida na resposta febril induzida por LPS, uma vez que houve redução significativa da temperatura com o tratamento dos animais com o UK-5099, inibidor da MPC-1. Como a MPC-1 é responsável pelo transporte de piruvato para a matriz mitocondrial, a inibição da MPC-1 diminui a entrada de piruvato para a mitocôndria, o que gera um efeito em cascata na atividade mitocondrial. É notável então o envolvimento do metabolismo energético para a gênese da febre.

Os dados respirométricos obtidos no decorrer deste estudo apresentam uma visão geral sobre a função mitocondrial hipotalâmica de animais tratados com LPS. Foi possível observar diferenças na capacidade respiratória nesta condição. Este trabalho enfatiza a importância do estudo do metabolismo energético e função mitocondrial na febre induzida por LPS.

Estudos complementares são necessários para confirmar os mecanismos mitocondriais envolvidos na febre e entender como a mitocôndria pode participar da manutenção da resposta febril.

## 9. REFERÊNCIAS

ARDEN, G. B.; RAMSEY, D. J. Diabetic retinopathy and a novel treatment based on the biophysics of rod photoreceptors and dark adaptation. **Webvision: The Organization of the Retina and Visual System**, p. 1–57, 2015.

BARTFAI, T.; CONTI, B. Fever. **TheScientificWorldJournal**, v. 10, p. 490–503, 2010.

BERRY, B. J. et al. Use the Protonmotive Force: Mitochondrial Uncoupling and Reactive Oxygen Species. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 21, p. 3873–3891, 2018.

BIGARELLA, C. L.; LIANG, R.; GHAFFARI, S. Stem cells and the impact of ROS signaling. **Development**, v. 141, n. 22, p. 4206–4218, 2014.

BLOMQVIST, A.; ENGBLOM, D. Neural Mechanisms of Inflammation-Induced Fever. **Neuroscientist**, v. 24, n. 4, p. 381–399, 2018.

BURTSCHER, J. et al. Mitochondrion Differences in mitochondrial function in homogenated samples from healthy and epileptic specific brain tissues revealed by high-resolution respirometry. **MITOCH**, v. 25, p. 104–112, 2015.

CORBET, C. Stem cell metabolism in cancer and healthy tissues: Pyruvate in the limelight. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JAN, p. 1–7, 2018.

DIAS, C. et al. Analysis of respiratory capacity in brain tissue preparations: high-resolution respirometry for intact hippocampal slices. **Analytical Biochemistry**, v. 551, n. January, p. 43–50, 2018.

DIVAKARUNI, A. S. et al. Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death. **Journal of Cell Biology**, v. 216, n. 4, p. 1091–1105, 2017.

DJAFARZADEH, S.; JAKOB, S. M. High-resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function in Permeabilized and Intact Cells. **Journal of Visualized Experiments**, n. 120, p. 1–11, 2017.

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.

FIGUEIRA, T. R. et al. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 16, p. 2029–2074, 2013.

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

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.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol. Behav.**, v. 47, p. 963–991. 1990.

GRAY, L. R. et al. Hepatic mitochondrial pyruvate carrier 1 is required for efficient regulation of gluconeogenesis and whole-body glucose homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 669–681, 2015.

GRAY, L. R.; TOMPKINS, S. C.; TAYLOR, E. B. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 14, p. 2577–2604, 2014.

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

HILL, S.; SATARANATARAJAN, K.; VAN REMMEN, H. Role of signaling molecules in mitochondrial stress response. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. 225, p. 1–9, 2018.

IANARO, A.; TERSIGNI, M.; D'ACQUISTO, F. New Insight in LPS Antagonist. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 306–317, 2009.

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

KARLSSON, M. et al. Diverse and tissue-specific mitochondrial respiratory response in a mouse model of sepsis-induced multiple organ failure. **Shock**, v. 45, n. 4, p. 404–410, 2016.

LI, X. et al. Mitochondrial pyruvate carrier function determines cell stemness and metabolic reprogramming in cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 28, p. 46363–46380,

2017.

MACKOWIAK, P.A.; BOULANT, J.A. Fever's glass ceiling. **Clin. Infect. Dis.**, v.22, p.525-536, 1996.

MAKRECKA-KUKA, M.; KRUMSCHNABEL, G.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry for simultaneous measurement of oxygen and hydrogen peroxide fluxes in permeabilized cells, tissue homogenate and isolated mitochondria. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1319–1338, 2015.

MÁRQUEZ, S. et al. Tricarboxylic Acid Cycle Activity and Remodeling of Glycerophosphocholine Lipids Support Cytokine Induction in Response to Fungal Patterns. **Cell Reports**, v. 27, n. 2, p. 525- 536.e4, 2019.

MCCOMMIS, K. S.; FINCK, B. N. Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. **The Biochemical journal**, v. 466, n. 3, p. 443–454, 2016.

MENGA, M. et al. Febrile temperature reprograms by redox-mediated signaling the mitochondrial metabolic phenotype in monocyte-derived dendritic cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 3, p. 685–699, 2018.

MILLS, E. L.; KELLY, B.; O'NEILL, L. A. J. Mitochondria are the powerhouses of immunity. **Nature Immunology**, v. 18, n. 5, p. 488–498, 2017.

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

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

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

NAPA, K. et al. LPS from *P. gingivalis* Negatively Alters Gingival Cell Mitochondrial Bioenergetics . **International Journal of Dentistry**, v. 2017, p. 1–6, 2017.

PESTA, D.; GNAIGER, E. High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. In:

MORENO, C. M. P. AND A. J. (Ed.). . **Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols**. [s.l: s.n.]. v. 810p. 25–58.

QUANSAH, E. et al. Targeting energy metabolism via the mitochondrial pyruvate carrier as a novel approach to attenuate neurodegeneration. **Molecular Neurodegeneration**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2018.

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.

SANCHO, D.; ENAMORADO, M.; GARAUDE, J. Innate immune function of mitochondrial metabolism. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 527, p. 1–9, 2017.

SAPER, C. B.; LOWELL, B. B. The hypothalamus. **Current biology : CB**, v. 24, n. 23, p. R1111-6, 2014.

SCHÖPF, B. et al. Oxidative phosphorylation and mitochondrial function differ between human prostate tissue and cultured cells. **FEBS Journal**, v. 283, n. 11, p. 2181–2196, 2016.

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

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

TRIPODI, F. et al. Methionine supplementation stimulates mitochondrial respiration. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 12, p. 1901–1913, 2018.

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. 14, p. 1–14, 2014.

VACANTI, N. M. et al. Regulation of substrate utilization by the mitochondrial pyruvate carrier. **Molecular Cell**, v. 56, n. 3, p. 425–435, 2014.

WALHEIM, E.; WIŚNIEWSKI, J. R.; JASTROCH, M. Respiromics – An integrative analysis linking mitochondrial bioenergetics to molecular signatures. **Molecular Metabolism**, v. 9, n. January, p. 4–14, 2018.

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

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

ZEIDLER, J. D. et al. Short-term starvation is a strategy to unravel the cellular capacity of oxidizing specific exogenous/endogenous substrates in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 34, p. 14176–14187, 2017.

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

ZHONG, Y. et al. Application of mitochondrial pyruvate carrier blocker UK5099 creates metabolic reprogram and greater stem-like properties in LnCap prostate cancer cells *in vitro*. **Oncotarget**, v. 6, n. 35, 2015.

ZOU, H. et al. MPC1 deficiency accelerates lung adenocarcinoma progression through the STAT3 pathway. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 3, 2019.

ZOU, S. et al. Fatty acid oxidation alleviates the energy deficiency caused by the loss of MPC1 in MPC1<sup>+/-</sup> mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 1008–1013, 2018.

## ANEXO



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 13 de dezembro de 2017.

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "INFLUÊNCIA DA REGULAÇÃO METABÓLICA MITOCONDRIAL PARA A GÊNESE E MANUTENÇÃO DA RESPOSTA FEBRIL.", Protocolo n.º 99/2017, sob responsabilidade da Professora Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus* (60 machos e 60 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/10/2017 a 31/07/2021.



*Fabiane*

Profa. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora 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.