

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MESTRADO

ESTUDO DO PAPEL DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE NO CONTEXTO DA INFLAMAÇÃO  
AVALIANDO PARÂMETROS CITOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E  
IMAGENS DE  $\mu$ PET/CT EM *ZEBRAFISH*

LUIZA REALI NAZARIO

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosane Souza da Silva

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Maria Moriguchi Jeckel

PORTO ALEGRE - RS

2016

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DO PAPEL DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE NO CONTEXTO DA INFLAMAÇÃO  
AVALIANDO PARÂMETROS CITOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E  
IMAGENS DE  $\mu$ PET/CT EM *ZEBRAFISH*

LUIZA REALI NAZARIO

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosane Souza da Silva

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Maria Moriguchi Jeckel

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

Prof<sup>a</sup>. Elizandra Braganhol

Prof<sup>a</sup>. Fernanda Bueno Morrone

Prof. Luiz Carlos Kreutz

PORTO ALEGRE – RS

2016

## AGRADECIMENTOS

A DEUS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e ao Instituto do Cérebro (INSCER) pela colaboração e disponibilização de laboratórios e equipamentos de pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS pela contribuição na minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/CAPES) pelo apoio financeiro necessário para a realização do projeto.

A minha orientadora Rosane Souza da Silva pelo acolhimento desde o 3º semestre de faculdade e por todos conhecimentos que me passou. Sei que meu crescimento como pesquisadora e minha vontade de me tornar cada vez melhor vem do exemplo e dedicação dela.

A minha coorientadora Cristina Maria Moriguchi Jeckel pela confiança depositada em mim.

Aos professores Carla Denise Bonan e Maurício Reis Bogo pela auxílio e inspiração.

A toda equipe do Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia da PUCRS e do INSCER pelo auxílio e amizade.

Às alunas de Iniciação Científica Francille e Jéssica pelo auxílio fundamental na realização deste trabalho e pela amizade.

As minhas colegas de Pós-Graduação Kesiane e Giovanna pelo companheirismo e ajuda para finalizar os experimentos.

Aos meus amigos e colegas de Laboratório Stefani, Fabiano, Bruno, Natália, Aline, Laura, Fernanda Z., Cassiano, Karina, Débora, Raphaela, Fernanda Cruz por todas as risadas, chimarrões, discussões, conselhos que me proporcionaram.

A TODOS os meus familiares que sempre acreditaram em mim, em especial a meus avós que passaram suas histórias e seu conhecimento ajudando na formação do meu caráter.

A minha Dinda por todo o apoio e aconselhamentos na minha vida acadêmica e pessoal.

Ao meu namorado Eduardo pelo incentivo, companheirismo, amor e principalmente pela compreensão durante o período de mestrado. Por acreditar e acompanhar meu sonho.

Aos meus irmãos Guilherme e Marcelo por toda a vida de amizade e amor que temos desde criança.

E principalmente aos meus pais Silvana e Juarez pela educação, amor, inspiração, consolos e incentivo em todos os momentos da minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

"A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez".

(George Bernard Shaw)

## RESUMO

O mecanismo de ação do LPS ainda não é completamente elucidado em vertebrados como os peixes, e se diferencia dos vertebrados superiores. Em *zebrafish*, o LPS é capaz de aumentar o recrutamento de células imunes e a expressão de genes relacionados com a resposta imune. O sistema purinérgico tem uma grande relação com a regulação do sistema imune e as respostas inflamatórias. O ATP é um nucleotídeo importante na secreção de citocinas e no recrutamento e diferenciação de células imunes, podendo ser sequencialmente desfosforilado gerando adenosina. No contexto da inflamação, a adenosina atua como uma molécula imunomodulatória inata. Participam do controle dos níveis extracelulares da adenosina, os transportadores de nucleosídeos e a ecto-5'-nucleotidase. A ecto-5'-nucleotidase é uma enzima com papel de marcapasso na produção de adenosina e constitui um dos focos do presente estudo. Considerando a contribuição da abordagem de análise de imagens no contexto do estudo da inflamação, é sabido que a captação do radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -FDG, um análogo da glicose está aumentada em roedores submetidos à inflamação, o que gera uma imagem diferenciada. O micro Tomógrafo por Emissão de Pósitron/Tomografia Computadorizada ( $\mu\text{PET}/\text{CT}$ ) é utilizado para pesquisas em animais de pequeno porte e obtém imagens utilizando um radiofármaco. O uso da  $\mu\text{PET}/\text{CT}$  contribui com informações a nível molecular, funcional e estrutural em tempo real e permite acompanhar o efeito de fármacos em situações fisiológicas/patológicas na escala de um animal diminuto como o *zebrafish*. A tecnologia do  $\mu\text{PET}/\text{CT}$  é relativamente nova e até o momento não existem estudos científicos publicados aplicando radiofármacos em *zebrafish*. Neste contexto, o objetivo do projeto foi estudar o envolvimento da enzima ecto-5'-nucleotidase no desenvolvimento de inflamação induzida por LPS utilizando-se de parâmetros citológicos, bioquímicos, moleculares e de imagem por  $\mu\text{PET}$  em diferentes tecidos de *zebrafish* adulto (*Danio rerio*). Para induzir inflamação no *zebrafish*, os animais foram injetados com uma solução de LPS (10  $\mu\text{g}/\text{g}$  de peso corporal; i.p) após terem sido submetidos à anestesia (tricaina 0.1 g/L). Os animais permaneceram por 2 h ou 24 h neste tratamento. Para confirmação da inflamação foram analisadas a expressão gênica de marcadores específicos (*tnf- $\alpha$*  e *cox-2*) em encéfalo, coração, rim e intestino e contagem diferencial de células do sistema imune. A atividade e expressão da enzima ecto-5'-nucleotidase foi analisada no encéfalo, coração, rim e intestino dos animais controle e tratados. Para manter os animais no  $\mu\text{PET}/\text{CT}$  foi realizada uma curva de concentração de anestésico MS-222 (0.1, 0.12, 0.15 g/L) e determinado um aparato para manter o peixe na presença de água mas, ainda imóvel. Uma curva de tempo após a injeção de  $^{18}\text{F}$ -FDG foi realizada para a obtenção de imagens em  $\mu\text{PET}/\text{CT}$  (0, 10, 20 e 30 min) e para a padronização da quantificação de radiação em um *Gamma counter* (15, 30, 60, 90 e 120 min). A exposição ao LPS foi capaz de aumentar a expressão de *tnf- $\alpha$*  em quase todos os tecidos estudados (coração, rim e intestino) e de *cox-2* no rim. O número de células brancas ativas do sangue periférico também foi aumentado, confirmando a indução da resposta inflamatória. A hidrólise de AMP em animais injetados com LPS foi aumentada no coração em 24 hpi [72% em relação ao controle] com nenhuma alteração na expressão gênica da ecto-5'-nucleotidase. A expressão gênica do ecto-5'-nucleotidase foi ajustada temporalmente no rim e intestino sem alteração da atividade enzimática. Após a padronização de imagens com  $\mu\text{PET}/\text{CT}$  e da quantificação de radiação por *Gamma counter* para cada órgão analisado, definiu-se 30 min como o melhor tempo para a biodistribuição do  $^{18}\text{F}$ -FDG. Após a aquisição de imagens em  $\mu\text{PET}$  de animais inflamados não se identificou alterações na captação do  $^{18}\text{F}$ -FDG comparado com o controle. A quantificação tecidual de radiação registrou uma queda nas amostras de ossos nos animais tratados com LPS, embora os demais tecidos não tenham sido alterados. Estes dados indicam que o *zebrafish* responde ao LPS alterando expressão gênica de marcadores específicos, especialmente no rim e ativando células brancas do sangue. A inflamação induzida parece estar acompanhada por um tênue ajuste tecido-específico da atividade e expressão da ecto-5'-

nucleotidase em resposta ao processo inflamatório. Ainda que a inflamação tenha sido confirmada, o registro de imagens por  $\mu$ PET e a determinação de radiação nos diferentes tecidos não foram capazes de registrar diferenças na atividade metabólica em animais tratados com LPS. Entretanto, a padronização destas técnicas oferece um avanço no uso de radiofármacos em animais de pequeno porte, como o zebrafish.

## ABSTRACT

The LPS mechanism of action is still not completely elucidated on vertebrates like fish, and indeed differs from higher vertebrates. In zebrafish, LPS is capable of increasing the recruitment of immune cells and the expression of genes related to the immune response. The purinergic system has a great relation to the regulation of the immune system and inflammatory responses. The nucleotide ATP is able to induce cytokine secretion, recruitment and differentiation of immune cells. ATP can be dephosphorylated sequentially generating adenosine. In the context of inflammation adenosine serves as an innate immunomodulatory molecule. The control of adenosine extracellular levels is performed by nucleoside transporters and ecto-5'-nucleotidase. The ecto-5'-nucleotidase is an ectonucleotidase with pacemaker role in the production of adenosine and is one of the focuses of this study. Considering the analysis of the input images approach to the study of inflammation context, it is known that in rodents the uptake of  $^{18}\text{F}$ -FDG, an analogue of glucose, is increased under inflammation, which generates a differential image. The micro Positron Emission Tomography/ Computed Tomography ( $\mu\text{PET}$  /CT) is used for research in small animals and take images using a radiopharmaceutical. The use of  $\mu\text{PET}$ /CT contributes with information at the molecular, structural and functional level and allows too monitor the effect of drugs in physiological / pathological situations in the range of a small animal as the zebrafish. The technology  $\mu\text{PET}$ /CT is relatively new and so far there are no published scientific studies applying radiopharmaceuticals in zebrafish. In this context, the aim of the project was to study the involvement of the enzyme ecto-5'-nucleotidase in the development of inflammation induced by LPS using the cytological, biochemical, molecular and image ( $\mu\text{PET}$ ) in different tissues of adult zebrafish (*Danio rerio*). To induce inflammation in zebrafish, the animals were injected with a solution of LPS (10 ug/g body weight, i.p) after being subjected to anesthesia (tricaine 0.1 g/L). The animals were kept for 2 hours or 24 hours in this treatment. For confirmation of inflammation were analyzed the gene expression of specific markers (*tnf- $\alpha$*  and *cox-2*) in encephalon, heart, kidney and intestine and differential counts of cells of the immune system. The activity and expression of ecto-5'-nucleotidase enzyme was analyzed in the encephalon, heart, kidney and intestine of control and treated animals. To keep the animals in  $\mu\text{PET}$ /CT was performed anesthetic concentration curve (tricaine - 0.1, 0.12, 0.15 g/L) and standardized an apparatus to keep the fish in the presence of water, but yet still. A curve of time after injection of  $^{18}\text{F}$ -FDG was performed to obtain images in  $\mu\text{PET}$ /CT (0, 10, 20 and 30 min) for standardizing the radiation quantitation in a gamma counter (15, 30, 60 90 and 120 min). Exposure to the LPS was able to increase the *tnf- $\alpha$*  expression in nearly all tissues studied (heart, kidney and intestine) and *cox-2* in the kidney. The number of active peripheral blood white cells was also increased, confirming the induction of the inflammatory response. Hydrolysis of AMP in animals injected with LPS was increased in the heart in 24 hpi [72% compared to control] with no change in gene expression of ecto-5'-nucleotidase. The gene expression of ecto-5'-nucleotidase was adjusted temporarily in the kidney and intestine without altering the enzyme activity. After patterning images with  $\mu\text{PET}$ / CT and quantitation radiation by gamma counter for each organ examined, 30 minutes was defined as the best time for the biodistribution of  $^{18}\text{F}$ -FDG. After acquiring inflamed animal  $\mu\text{PET}$  images it was not identified changes in the uptake of  $^{18}\text{F}$ -FDG compared to the control. Tissue quantification radiation

registered a decrease in bone samples in animals treated with LPS, while other tissues have not changed. These data indicate that zebrafish responds to LPS by altering gene expression of specific markers, especially in kidney, and activation of white blood cells. The inflammation appears to be accompanied by a fine adjustment tissue-specific expression and activity of ecto-5'-nucleotidase in response to the inflammatory process. Although inflammation has been confirmed, the registration images by  $\mu$ PET and radiation determination in different tissues have not been able to register differences in metabolic activity in animals treated with LPS. However, standardization of these techniques provides an advance in the use of radiopharmaceuticals in small animals, such as zebrafish.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA - Adenosina Desaminase

ADP - Adenosina 5' Difosfatado

AK - adenosina-quinase;

AMP - Adenosina 5' monofosfato

ATP - Adenosina 5' trifosfatado

CD 39 - *Cluster of Differentiation 39* (ENTPDase)

CD 73 - *Cluster of Differentiation 73* (5' nucleotidase)

CT – Tomografia Computadorizada

ecto-ADA - ecto adenosina deaminase

E-NPP - Ectonucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase

FDG - fluorodesoxiglicose

G-6P - glicose-6-fosfato

GLUT - transportador de glicose

HIF - receptor indutor de hipóxia

IFNs - interferons

IL-1 $\beta$  - interleucinas

IMP - Monofosfato de inosina

LECT2 - *leukocyte cell-derived chemotaxin 2*

LPS - Lipopolisacarídeo

NF $\kappa$  $\beta$  - fator nuclear kappa  $\beta$

NT - Transportador de Nucleosídeos

NTPDase - Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases

P1 – Receptores Purinérgico 1

P2 - Receptores Purinérgico 2

PET – Tomógrafo por Emissão de Póstron

ROS - Espécie Reativa de Oxigênio

SAA - *serum amyloid A*

TGF- $\beta$  - *transforming growth factor*

TLR –Receptor toll-like

TNF- $\alpha$  - *tumor necrosis factor*

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Diagrama mostrando alguns dos principais componentes intra e extracelulares do Sistema Purinérgico..... | 6  |
| Figura 2: Foto do $\mu$ PET/CT localizado no InsCer.....  | 10 |
| Figura 3: A cascata inflamatória e a captação do FDG.....   | 12 |
| Figura 4: Aparato utilizado por Kabli et al. (2006).....  | 15 |
| Figura 5: Imagem de PET utilizando $^{18}\text{F}$ -FDG como radiofármaco em Goldfish.....                        | 15 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>JUSTIFICATIVA.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>CAPÍTULO 2.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                    | <b>22</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS.....</b> | <b>35</b> |

# CAPÍTULO 1

---

## INDÍCE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.1 Inflamação e Sistema Purinérgico.....</b>                  | <b>4</b>  |
| <b>1.2 Radiofármacos, PET/CT e Inflamação.....</b>                | <b>8</b>  |
| <b>1.3 Zebrafish.....</b>   | <b>13</b> |
| 1.3.1 <i>Zebrafish</i> e métodos de detecção de imagem.....       | 13        |
| 1.3.2 <i>Zebrafish</i> e o estudo da adenosina na inflamação..... | 16        |
| <b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>                                      | <b>18</b> |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral.....</b>                                    | <b>20</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos.....</b>                             | <b>20</b> |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Inflamação e Sistema Purinérgico

A resposta inflamatória compreende reações vasculares e celulares, reguladas por vários mediadores, tais como, fatores químicos derivados de proteínas do plasma (Condie et al., 1968). O lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como endotoxina, é uma molécula tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas (Tuin et al., 2006). Essa substância ativa macrófagos e células dendríticas no sistema imune inato e por este motivo é um consolidado modelo de indução de inflamação (Meng and Lowel 1997; Abdi et al 2012) . O sistema purinérgico tem uma grande relação com a regulação do sistema imune e as respostas inflamatórias, em especial nas interações célula-célula, secreção de citocinas e quimiocinas, remoção de patógenos intracelulares e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hasko et al., 2008; Trautmann, 2009; Junger, 2011).

A adenosina trifosfato (ATP) é um nucleotídeo importante na secreção de citocinas e no recrutamento e diferenciação de células imunes (Bours et al, 2006). Este pode ser liberado por mecanismos fisiológicos ou em resposta a danos celulares, atuando em receptores específicos, denominados purinoreceptores, como está demonstrado na figura 1 (Burnstock, 1972; 1976; 2008; Ralevic e Burnstock, 1998). Estudos demonstram que células inflamatórias podem liberar ATP via hemicanais de panexina (proteínas transmembrana que conectam o meio intracelular com o extracelular) ou conexina (proteínas de junções *gap*) (Eltzschig et al., 2006, 2008; Chekení et al., 2010). O ATP pode atuar nos purinoreceptores P2 que são subdivididos em duas famílias, os receptores ionotrópicos P2X (P2X<sub>1-7</sub>) e metabotrópicos P2Y (P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>). O controle dos níveis extracelulares de ATP ocorre pela hidrólise deste realizada pelas ectonucleotidases, as quais incluem as ecto-nucleosídeo-trifosfo-difosfohidrolases (E-NTPDases/CD39), as

ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPP), as fosfatases alcalinas e as ecto-5'-nucleotídeses (CD73) (Zimmermann, 2001). O AMP, ao ser hidrolisado pela CD73, gera adenosina. A adenosina, por sua vez, atua nos receptores P1 que são subdivididos em A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (Zimmermann, 2011; Burnstock, 2004; Robson et al., 2006), sendo um importante modulador que exerce atividades estimulatórias através dos receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> e atividades inibitórias através dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> (Burnstock, 2004).

Ainda, as concentrações de adenosina podem sofrer impacto de transportadores de nucleosídeos que atuam sobre o controle dos níveis extracelulares de adenosina. Transportadores concentrativos transportam adenosina contra o gradiente de concentração de maneira sódio-dependente, enquanto os transportadores equilibrativos, transportam adenosina bidirecionalmente através da membrana de maneira sódio-independente (Yao et al., 1997; Kiss et al., 2000; Ward et al., 2000). A concentração de adenosina pode ser afetada a partir de sua hidrólise pela adenosina deaminase (ADA), que converte a adenosina e a deoxiadenosina à inosina e deoxiinosina, respectivamente (Franco et al., 1998; Romanowska et al., 2007), possuindo um papel importante no sistema imune durante processos inflamatórios (Zavialov e Engström, 2005). Esta enzima pode ser encontrada em duas formas: enzima citosólica e também expressa na superfície celular como uma ecto-enzima. (Hirschhorn e Ratech, 1980; Zavialov e Engström, 2005; Boison, 2012).

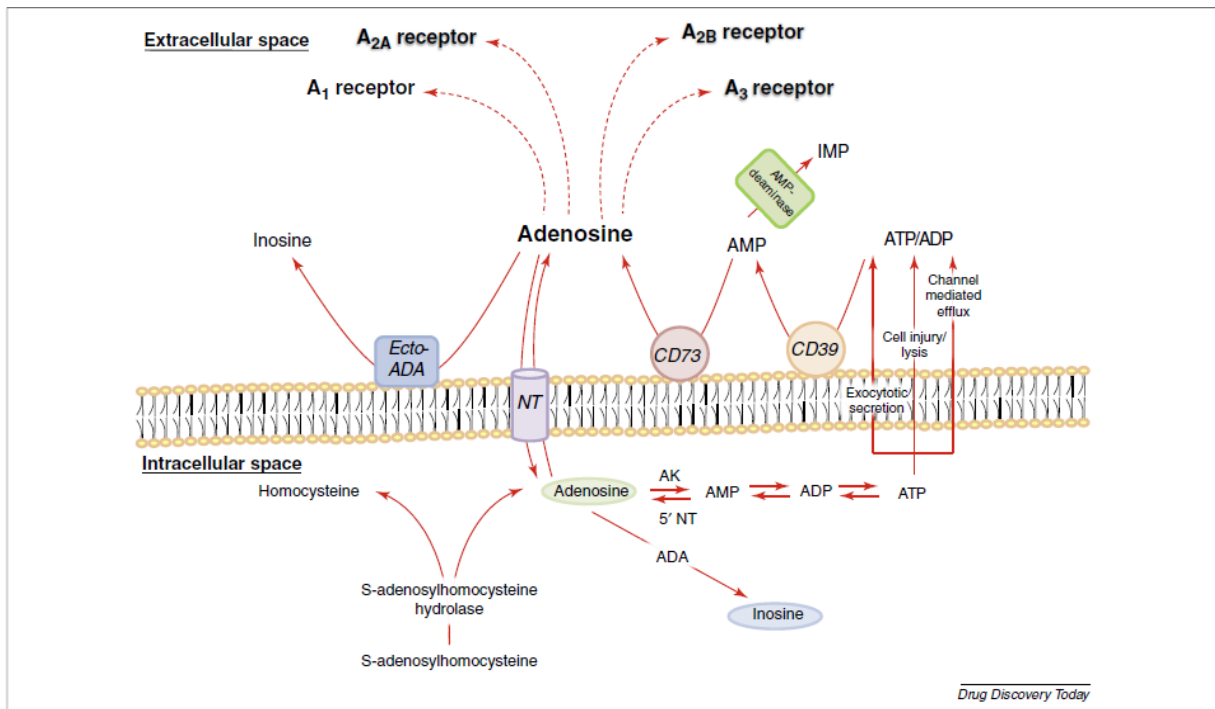


Figura 1: Diagrama mostrando alguns dos principais componentes intra e extracelulares do Sistema Purinérgico. CD39: Ecto-ATPase; CD73: ecto-5'-nucleotidase; ecto-ADA: ecto adenosina deaminase; AK: adenosina-quinase; ADA: adenosina deaminase; NT: Transportadores de nucleosídeo; ATP: Trifosfato de adenosina; ADP: difosfato de adenosina; AMP: Monofosfato de adenosina; IMP, Monofosfato de inosina. (Antonioli et al., 2014).

No contexto da inflamação, a adenosina atua como uma molécula imunomodulatória inata, aumentando suas concentrações extracelulares de forma dramática durante o estado inflamatório (Fredholm et al., 2001). Em roedores, linfócitos T possuem a capacidade de gerar adenosina graças à alta expressão de ecto-ATPases e ecto-5'-nucleotidase (Longhi et al., 2013). A enzima ecto-5'-nucleotidase parece elevar sua expressão gênica e função na presença de mediadores inflamatórios, tais como *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ), interferons (IFNs), *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (exemplo IL-1 $\beta$ ) e prostaglandina E2, o que sugere



o envolvimento desta enzima nos processos inflamatórios. De fato, a descrição original da ecto-5'-nucleotidase corresponde à sua função de marcador para a identificação de linfócitos B em diferentes estágios de maturação. Em linfócitos de camundongos, a exposição ao LPS promoveu o aumento da hidrólise de nucleotídeos, a qual foi prevenida pela coadministração com um agonista de receptores  $A_{2A}$  (Vuaden et al., 2011). O controle dos níveis extracelulares de ATP e adenosina, exercido especialmente pelas ecto-nucleotidases, promove um ajuste fino entre os mecanismos pró-inflamatórios exercidos pelo ATP e os anti-inflamatórios exercidos pela adenosina. A expressão das famílias de ectonucleotidases em linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e endoteliais é parte essencial do mecanismo de controle dos níveis destes nucleosídeos e nucleotídeos no ambiente pericelular e da progressão dos processos inflamatórios (Antonioli et al., 2014).

A importância dos receptores adenosinérgicos no contexto da inflamação, em especial o subtipo  $A_{2A}$ , tem sido intensamente estudada, entretanto a participação dos demais subtipos de receptores ainda permanece pouco elucidada. Em linfócitos B, os receptores adenosinérgicos são intensamente expressos, embora a ativação de receptores do subtipo  $A_3$  iniba a proliferação deste tipo celular (Saze et al., 2013). Em linfócitos T, a ativação de receptores do tipo  $A_{2A}$  é capaz de prevenir a apoptose deste tipo celular por um mecanismo mediado pela subunidade regulatória da proteína quinase A (Himer et al., 2010). Em células endoteliais, a ativação de  $NF\kappa\beta$  (fator nuclear kappa  $\beta$ ) induzida por LPS é reduzida na presença de antagonistas de receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  (Yang et al. 2014). Em macrófagos, a adenosina é capaz de aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias por um mecanismo dependente de receptores  $A_{2A}$  (Hasko e Crosntein, 2013). Estudos sobre a dinâmica de microglia em direção a tecidos danificados após exposição ao LPS demonstraram que o antagonismo dos receptores  $A_{2A}$  é capaz de prevenir a retração de microglia ativadas, sugerindo que, pelo menos em parte, as propriedades neuroprotetivas de antagonistas de

receptores A<sub>2A</sub> poderiam ser explicadas pela inibição destes receptores em microglia (Gyoneva et al., 2014). O receptor A<sub>2B</sub> parece estar envolvido na inibição da produção de TNF- $\alpha$  induzido por LPS, o que foi confirmado em estudos com camundongos sem a expressão de receptores A<sub>2A</sub> (Kara et al., 2010). Receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> são intensamente expressos em macrófagos, apesar da função destes receptores neste tipo celular não ser completamente elucidada (Hasko e Crosntein, 2013). Em células dendríticas humanas, a exposição ao LPS foi capaz de aumentar a expressão gênica dos receptores A<sub>2A</sub> (Novitskiy et al., 2008). Em situações de neuroinflamação, a exposição ao LPS promove o aumento na expressão de receptores A<sub>2A</sub> em neuroglia de ratos (Smith et al., 2014).

O ajuste na expressão dos receptores adenosinérgicos em células envolvidas na resposta imune durante um evento inflamatório vem de encontro com a regulação da atividade das ectonucleotidases a fim de estabelecer a modulação adenosinérgica adequada. Entretanto, a contribuição da tríade formada pela ação enzimática da ecto-5'-nucleotidase, a liberação de adenosina por transportadores específicos e a atuação desta nos diferentes subtipos de receptores ainda carece de informações, considerando a importância dos níveis de adenosina no controle de proliferação de células envolvidas nos processos inflamatórios.

## **1.2 Radiofármacos, PET/CT e inflamação**

A Medicina Nuclear pode identificar alterações na fisiologia e na morfologia de determinados tecidos e ser definida como uma especialidade médica que utiliza compostos radioativos com o objetivo de obter imagens para diagnosticar, tratar doenças (Araújo et al., 2008), utilizar em pesquisas clínicas (Jacobs et al., 2003) e contribuir para o desenvolvimento de novas drogas (Lee e Farde, 2006). Cerca de 95% da aplicação da Medicina Nuclear é utilizada

para o diagnóstico clínico e apenas 5% para tratamento (Saha et al., 2010). Mesmo assim, no Brasil, esta técnica não é muito utilizada comparando com outros países mais desenvolvidos. Entretanto, esta lacuna apresenta-se como um importante alvo de investimentos para o desenvolvimento científico do país.

Um radiofármaco pode ser definido como um composto radioativo que consiste em dois componentes, um radionuclídeo (radioativo) e uma molécula farmacêutica ligada a ele, este material é administrado no indivíduo e pode ser detectado conforme sua afinidade pelas moléculas do organismo de interesse por um equipamento chamado Tomógrafo por Emissão de Pósitrons (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*), o qual é capaz de obter imagens *in vivo* de pequenos animais ou humanos por um método não invasivo (Khalil, 2011). Para obtenção da imagem em PET/CT é necessária a administração de uma substância marcada com uma molécula radioativa emissora de pósitrons que será captada por alguma estrutura orgânica de acordo com a sua afinidade. O PET tem a capacidade de detectar a biodistribuição em concentrações picomolares de biomoléculas radioligantes que, juntamente com a Tomografia Computadorizada (CT, do inglês *Computerized Tomography*), obtêm essa imagem a nível molecular, funcional e estrutural, o que facilita a identificação da localização exata do radiofármaco ligado ao alvo de interesse (Kersemans et al., 2011). Estas duas abordagens, quando utilizadas de forma integrada, formam o PET/CT (Beyer et al., 2000). Em um aparelho PET/CT, utilizado na clínica, as imagens são captadas em sequência, o qual é igual ao utilizado na pesquisa com animais, porém em escala menor, denominado  $\mu$ PET/CT (Figura 2). A combinação das duas técnicas reduz o tempo de captura da imagem, resultando numa imagem com características funcionais, anatômicas e de melhor resolução (Townsend, 2004).



Figura 2: Foto do  $\mu$ PET/CT localizado no InsCer. Fonte: Foto tirada pelo autor.

O tempo de meia vida curta da maioria dos radiofármacos emissores de pósitrons pode ser uma desvantagem para a utilização deste método, pois a localização do ciclotron deve ser próxima ao local de aplicação do marcador. Por outro lado, seu rápido decaimento pode ser considerado como uma vantagem, pois doses maiores podem ser administradas com o objetivo de obter uma boa imagem (Elsinga et al., 2012). Os radiofármacos utilizados para técnicas com PET/CT são chamados de *short-lived positron-emitting radionuclide*, ou seja, aqueles que têm um tempo de meia-vida curto, sendo este considerado o tempo necessário para reduzir sua atividade inicial pela metade ( $t_{1/2}$ ). Com isso, só podem ser utilizados se a instituição onde se realizam os exames for próxima à localização de um ciclotron (Saha et al., 2010).

Como exemplo de radioisótopos frequentemente usados na clínica e pesquisa, pode-se citar:  $^{11}\text{C}$  ( $t_{1/2} = 20.38$  min),  $^{13}\text{N}$  ( $t_{1/2} = 9.96$  min),  $^{15}\text{O}$  ( $t_{1/2} = 122.2$  s) e  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2} = 109.8$  min) (Schiepers, 2006). O  $^{18}\text{F}$  é um dos melhores radioisótopos para ser utilizado, isto se deve a diversas razões, tais como: (1) emite uma baixa energia, o que gera uma imagem de alta

resolução; (2) pode ser produzido com atividade específica e em grandes quantidades; (3) pode reagir com várias moléculas inorgânicas e orgânicas; (4) gera radiação aceitável para se utilizar em pacientes; e (5) a meia vida é relativamente curta (Vallabhajosula, 2009). O  $^{18}\text{F}$ -FDG (fluorodesoxiglicose) é um análogo da glicose em que o grupo hidroxila do carbono 2 de uma molécula de glicose é substituído por um átomo de flúor. Como a glicose, o  $^{18}\text{F}$ -FDG é incorporado em células vivas por transporte facilitado e em seguida, fosforilado por hexoquinase. Ao contrário da glicose, o  $^{18}\text{F}$ -FDG não pode ser submetido ao metabolismo subsequente, visto que o grupo hidroxila do carbono 2 é um requisito para tal processo (Figura 3). No entanto, a  $^{18}\text{F}$ -FDG é um bom indicador da taxa de captação celular de glicose e da viabilidade celular (Silverman et al. 1970; Gallagher et al. 1978).

Considerando a contribuição da abordagem de análise de imagens ao contexto do estudo da inflamação, é sabido que a captação do  $^{18}\text{F}$ -FDG está aumentada em roedores submetidos à inflamação quando comparados com um grupo controle (Entok et al., 2014). Na resposta inflamatória o consumo de glicose é aumentado, o que permite a captação de uma imagem diferenciada. O acúmulo de  $^{18}\text{F}$ -FDG na inflamação e doenças infecciosas baseia-se na elevada captação de glicose realizada pelos granulócitos ativados. Este acúmulo é baseado no fato de que estas células usam glicose como fonte de energia somente após a ativação, durante a explosão metabólica ocorrente no processo inflamatório (Signore e Glaudemans, 2011). Embora tal captação possa produzir resultados falso-positivos em pacientes com câncer, pois nesta doença existe um aumento do número de transportadores de glicose nas células malignas (Mochizuki T et al., 2001), em modelos animais o  $^{18}\text{F}$ -FDG tem se demonstrado um marcador com uma ótima resposta (Wu et al., 2013; Entok et al., 2014). Na figura 3 está representado a cascata inflamatória e a captação celular de FDG.

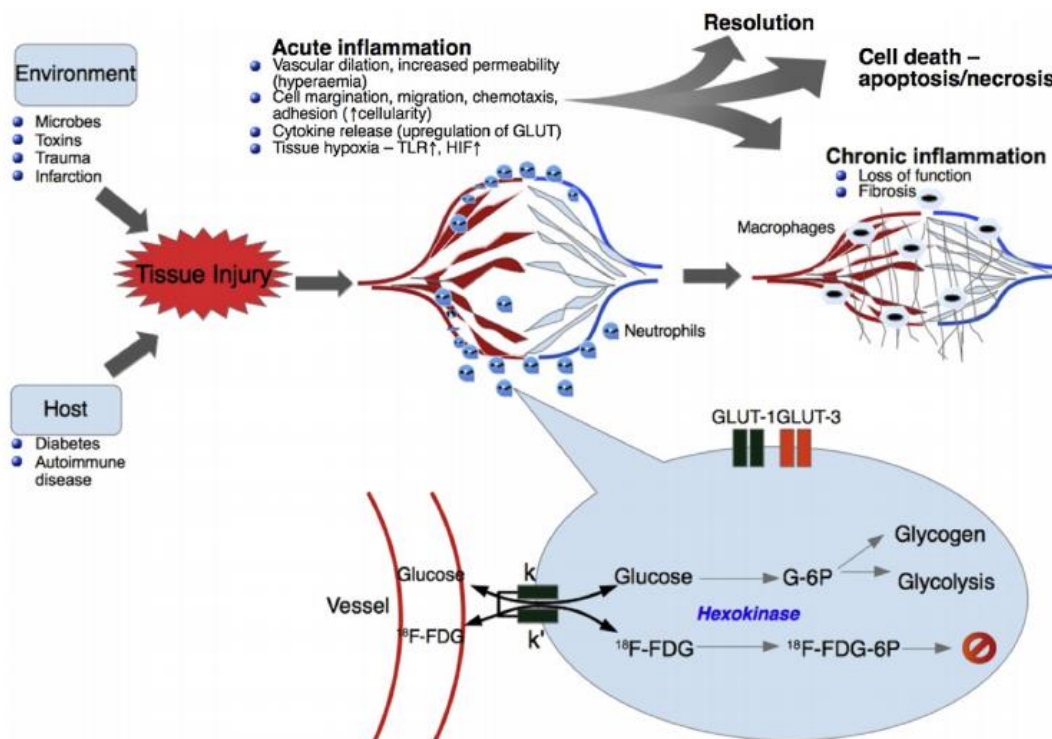


Figure 3: A cascata inflamatória e a captação do FDG. GLUT, transportador de glicose; TLR, *toll-like receptor*; HIF, hipóxia receptor indutor de, G-6P, glicose-6-fosfato; FDG, fluorodesoxiglicose. (Vaidyanathan et al., 2015)

Na pesquisa básica, estudos utilizando animais de pequeno porte, como roedores, ao utilizarem o  $\mu$ PET/CT geram uma melhor resolução ao capturar as imagens, as quais podem possuir dimensões de 10  $\mu\text{m}$  ou menos (Ritman, 2007; Rowland e Cherry, 2008). A busca por modelos animais alternativos que reduzam o uso de radiação através da técnica de  $\mu$ PET/CT tem sido encorajada. Neste contexto, o *zebrafish* (*Danio rerio*) tem se apresentado como um interessante modelo.

### 1.3 *Zebrafish*

O *zebrafish* é um pequeno peixe teleosteo de água doce originário do sul da Ásia, o qual exibe grande adaptabilidade para a criação em cativeiro. O indivíduo adulto mede de 3 a 4 cm, exibe dimorfismo sexual marcante, expectativa de vida entre 2 a 4 anos, fecundação externa, alta produção de ovos por fêmea (aproximadamente 200 ovos/postura) e o embrião se desenvolve de forma rápida em um ovo translúcido. Tais características foram de grande importância para a popularização inicial do *zebrafish* como modelo para estudos científicos, em especial estudos sobre bioquímica, farmacologia, toxicologia, neurobiologia, fisiologia (Zon & Peterson, 2005; Senger et al., 2006; Seibt et al., 2009; Egan et al., 2009; Grossman et al., 2010; Lee et al., 2010). Pode-se salientar três das grandes vantagens do uso do *zebrafish* na pesquisa, sendo estas: o baixo custo, o rápido desenvolvimento e o repertório de ferramentas desenvolvidas que descrevem atributos importantes da biologia desta espécie (Goldsmith, 2004; Karlovich et al., 1998, Spence, 2008).

O sequenciamento do genoma do *zebrafish*, concluído em 2013, instituiu uma das mais importantes ferramentas. Tal estudo demonstrou que 71% dos genes que codificam proteínas no genoma humano são relacionados a genes encontrados no genoma do *zebrafish*, e que destes, 84% daqueles genes conhecidos por serem associados a doenças humanas possuem um gene homólogo em *zebrafish* (Howe et al., 2013).

#### 1.3.1 *Zebrafish* e Métodos de detecção de imagem

Experimentos realizados com 5 diferentes espécies de peixes de grande porte (acima de 500g) determinaram que o padrão de captação do  $^{18}\text{F}$ -FDG em diferentes órgãos não se difere entre as espécies (Browning et al., 2013). Adicionalmente, neste mesmo estudo uma comparação

entre peixes, roedores e humanos demonstrou que os peixes exibem uma maior similaridade com humanos com relação a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG nos órgãos observados por análise com PET/CT, evidenciando a importância do desenvolvimento deste tipo de abordagem (Browning et al., 2013). Considerando o *zebrafish*, este tem a possibilidade de ser visualizado por inteiro utilizando  $\mu\text{CT}$ , devido ao fato de ser um animal pequeno e de fácil manipulação comparado com outros modelos animais (Cheng et al. 2011). Outras técnicas de imagem já foram adotadas para obter imagens do *zebrafish*, como a  $\mu\text{MRI}$  (Microressonância Magnética), sendo este o primeiro estudo para detectar os locais de invasão, estado e características dos melanomas internos no *zebrafish*, sugerindo que técnicas não invasivas podem ser aplicadas a estudos longitudinais para controlar o desenvolvimento do tumor e avaliar em tempo real os efeitos terapêuticos em modelos de tumor em *zebrafish* (Kabli et al. 2006, 2010). A figura 4 é uma imagem retirada do artigo de Kabli et al. 2006, a qual apresenta o aparato utilizado e as imagens de um *zebrafish* em  $\mu\text{MRI}$ . Imagens com  $^{18}\text{F}$ -FDG em outros modelos de peixes como o *goldfish* já foram realizadas demonstrando um padrão de distribuição que oferece informações interessantes sobre a taxa metabólica dos diferentes tecidos (Figura 5) (Koba et al. 2013). Entretanto, não há estudos científicos relatando o uso do *zebrafish* utilizando a técnica de imagem com  $\mu\text{PET/CT}$ .



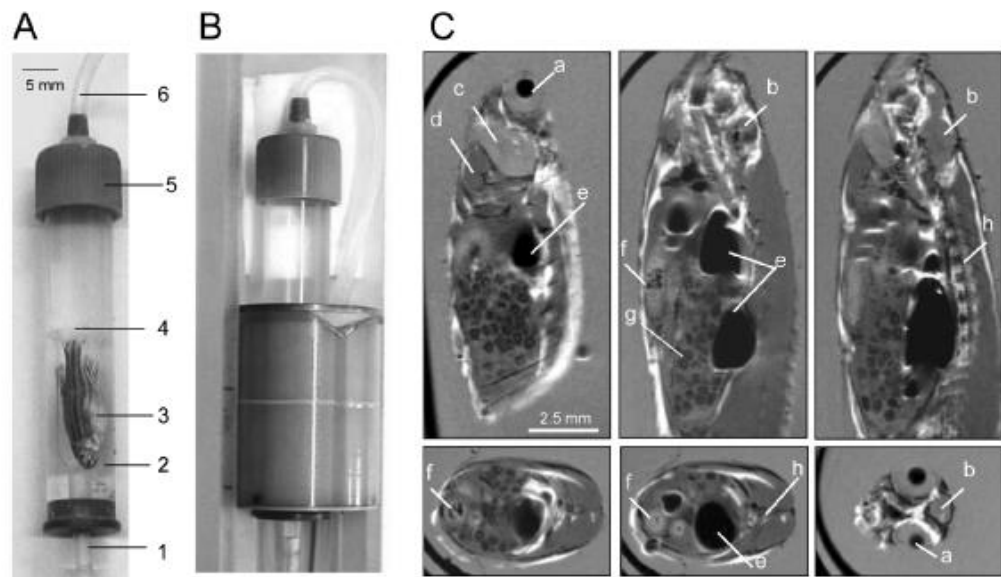


Figure 4: Aparato utilizado por Kabli et al. (2006) (A) Projeto de câmara de fluxo para medições de  $\mu$ MRI *in vivo*. (B) Tubo para  $\mu$ MRI (C) Imagens de  $\mu$ MRI de *zebrafish* adultos anestesiados. Legenda: a) olho; b) cérebro; c) brânquias; d) coração; e) bexiga natatória; f) intestino; g) ovos; h) myoseptum horizontal. Kabli et al., 2006.

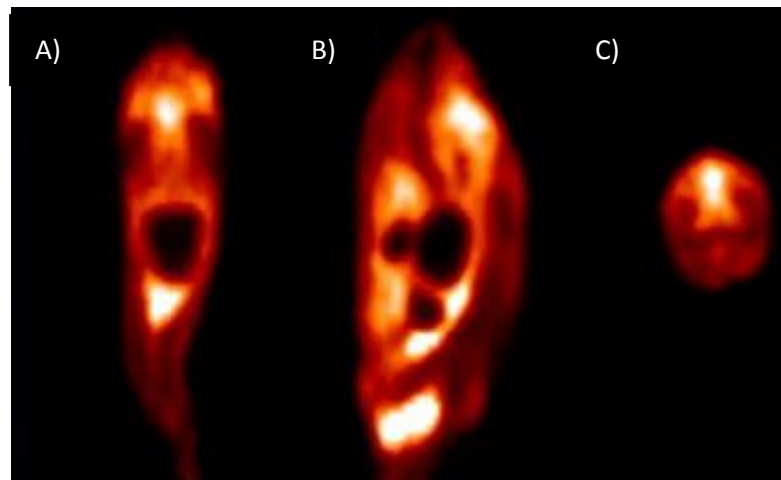


Figura 5: Imagem de PET utilizando  $^{18}\text{F}$ -FDG como radiofármaco em Goldfish (Coronal (A), sagital (B), e axial imagem (C)). Retirado de Koba et al. (2013).

### 1.3.2 *Zebrafish* e o estudo da adenosina na inflamação

No que se refere ao estudo dos receptores adenosinérgicos e da atividade de hidrólise de nucleotídeos, muito nosso grupo tem contribuído para o estabelecimento do *zebrafish* como um modelo para o estudo do sistema purinérgico. Em *zebrafish*, os receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> já foram descritos, sendo o A<sub>2A</sub> o produto de dois genes descritos em *zebrafish* como: *adora<sub>2a1</sub>* e *adora<sub>2a2</sub>* (Capiotti et al., 2011; Boehmler et al., 2009). A hidrólise de nucleotídeos, bem como a degradação de adenosina, em membranas cerebrais de *zebrafish* também foram caracterizadas pelo nosso grupo de pesquisa (Rico et al., 2003, Senger et al., 2004, Rosemberg et al., 2007).

O sistema imune do *zebrafish* pouco difere do de mamíferos porém, o baço e o rim assumem um papel importante na hematopoiese de forma semelhante à medula óssea em mamíferos, pois os peixes não possuem cavidade medular (Menke et al., 2011). O *zebrafish* apresenta linfócitos B e T, presença de antígenos, células fagocíticas e imunidade humoral (Loynes et al., 2010; Vojtech et al., 2009). As células brancas possuem um aspecto diferente, tendo os linfócitos uma prevalência de 71-92% e os monócitos de 5-15% dos leucócitos circulantes em *zebrafish* (Murtha et al., 2003).

Embora o mecanismo de ação do LPS não seja elucidado em vertebrados como os peixes, e de fato se diferencie dos vertebrados superiores, a avaliação de uma curva dose resposta ao LPS em *zebrafish* adultos demonstrou o aumento na expressão gênica de genes relacionados com a resposta imune, tais como o *serum amyloid A* (SAA) e o *leukocyte cell-derived chemotaxin 2* (LECT2) (Gonçalves et al., 2012). Estudos com larvas de *zebrafish* demonstram que a injeção de LPS no saco vitelínico foi capaz de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (*il-6*, *tnf-α* and *il-1β*) causando migração de neutrófilos e macrófagos para o local da injeção, o que não ocorreu quando a larva foi imersa em uma solução de LPS (Yang et al. 2014). Entretanto, a

imersão em uma alta concentração de LPS por mais de 84 hpe (horas pós exposição) causou uma alta mortalidade em larvas de *zebrafish* (Leite et al. 2012).

Estudos utilizando o *zebrafish* como modelo de inflamação, verificaram que receptores purinérgicos podem mediar a ativação da enzima conversora de IL-1 e a liberação de IL-1, resultante de diferentes vias de sinalização celular, sugerindo que, embora os mecanismos da secreção de IL-1 estejam mantidos durante a evolução, sinais inflamatórios distintos são selecionados para a secreção desta citocina em diferentes vertebrados (López-Castejón et al., 2007). Adicionalmente, modelos de inflamação através da exposição de larvas de *zebrafish* ao cobre identificaram uma redução na hidrólise de AMP e adenosina, acompanhada de alterações na expressão das enzimas responsáveis pela degradação destes (Leite et al., 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

O uso do *Zebrafish* na pesquisa tem promovido contribuições consideráveis nas últimas décadas. O conjunto de informações da biologia deste animal aliado ao número de técnicas adaptadas para o seu uso fazem do *zebrafish* um modelo animal em plena ascensão. No Brasil, nosso grupo de pesquisa foi um dos pioneiros na implementação da criação do *zebrafish* para fins de pesquisa e, atualmente, possuímos uma colônia de animais com estratégias de manejo estabelecidas, as quais tem servido de referência não só em nosso país, mas para grupos de pesquisa de outros países da América Latina. O laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia da PUCRS está, há 15 anos, investigando a participação do Sistema Purinérgico em diferentes situações fisiológicas e patológicas. O presente trabalho teve como foco a análise da atividade e expressão tecido-específica da enzima ecto-5'-nucleotidase em um modelo de inflamação em *zebrafish*, associada ao uso das técnicas de detecção de imagens por  $\mu$ PET/CT, análise citológica de amostras sanguíneas e análise da expressão de marcadores inflamatórios.

Existem poucos estudos relatando a relação tecido-específica da atividade e expressão da ecto-5'-nucleotidase com relação à inflamação. Entretanto, o estudo do envolvimento do controle dos níveis de adenosina é um importante contribuidor para a pesquisa dos mecanismos da inflamação e da resolução da mesma, especialmente ao se analisar como cada tecido responde ao modelo de inflamação e qual o efeito sobre a ecto-5'-nucleotidase nos diferentes tecidos. O acréscimo de análises de imagem com o uso do  $\mu$ PET/CT contribuem para o estudo com informações da atividade metabólica global em uma situação de inflamação .

Na literatura não se encontra nenhum estudo utilizando o *zebrafish* como modelo para imagens com  $\mu$ PET/CT. A adaptação do  $\mu$ PET/CT para o uso em *zebrafish* torna-se atrativa em

diferentes níveis, em especial no que se refere à: (1) Contribuição aos estudos pré-clínicos através de imagens longitudinais em animal inteiro, (2) Adaptação de uma técnica de alto refinamento, a qual é pouco invasiva, em um modelo já bem estabelecido, e (3) Contribuição para a cadeia de procedimentos disponíveis para a avaliação de agentes terapêuticos e diagnósticos, em especial no que se refere ao estudo da biodistribuição e farmacodinâmica em fase pré-clínica. Uma vez estabelecido o modelo de análise de imagens em *zebrafish* através do  $\mu$ PET/CT utilizando o  $^{18}\text{F}$ -FDG, considerando seu consolidado uso na clínica e na pesquisa básica, será possível ampliar o uso deste protocolo para outros radiofármacos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral:

Estudar o envolvimento da enzima ecto-5'-nucleotidase no desenvolvimento de inflamação induzida por LPS utilizando-se de parâmetros citológicos, bioquímicos, moleculares e de imagem por  $\mu$ PET/CT em diferentes tecidos de *zebrafish* adulto (*Danio rerio*).

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar a indução de inflamação por LPS em *zebrafish* adulto através da contagem diferencial de células brancas e da expressão de marcadores inflamatórios (*tnf- $\alpha$*  e *cox<sub>2</sub>*) em coração, rim, intestino e encéfalo de *zebrafish*;

- Padronizar a atividade enzimática da ecto-5'-nucleotidase em coração, rim e intestino de *zebrafish*;

- Avaliar a atividade enzimática e a expressão gênica da ecto-5'-nucleotidase em coração, rim, intestino e encéfalo de *zebrafish* submetidos ao LPS por 2 ou 24 horas;

- Padronizar o tempo de permanência no aparato e a curva dose/resposta do *zebrafish* ao  $^{18}\text{F}$ -FDG para aquisição de imagens em  $\mu$ PET/CT;

- Adquirir imagens com  $\mu$ PET em um modelo de inflamação induzido por LPS em *zebrafish*;

- Padronizar a quantificação de radiação em coração, rim, intestino, sangue, músculo, fígado, ossos, encéfalo e carcaça de *zebrafish* após injeção de  $^{18}\text{F}$ -FDG;

- Quantificar a radiação em coração, rim, intestino, sangue, músculo, fígado, ossos, encéfalo e carcaça de *zebrafish* após injeção de  $^{18}\text{F}$ -FDG em animais submetidos ao LPS; e

- Avaliar a existência de correlação entre o padrão de imagens geradas pelo  $^{18}\text{F}$ -FDG e a atividade de hidrólise e expressão gênica da ecto-5'-nucleotidase em *zebrafish* adulto submetido ao LPS.

# CAPÍTULO 2

---

## DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos estudos têm demonstrado que o mecanismo de ação do LPS em mamíferos é diferente daquele encontrado em outros grupos, tais como, os peixes. Em mamíferos, o LPS age através dos receptores TLR e em peixes, mesmo estes possuindo todos os ortólogos destes receptores, o mecanismo de ação desta endotoxina ainda não está bem estabelecido (Jault et al., 2004; Meiyer et al., 2004; Novoa et al., 2009; Yang et al., 2014). Os resultados apresentados no Capítulo 2 confirmaram, através de métodos citológicos e moleculares, o desenvolvimento de resposta inflamatória em *zebrafish* adulto 2 horas pós-injeção (hpi) e 24 hpi intraperitoneal de LPS. O desenvolvimento de inflamação foi verificado pelo aumento de neutrófilos e monócitos e pelo aumento na expressão de marcadores específicos como *tnf- $\alpha$*  e *cox-2*, especialmente 2hpi. Observou-se que o rim foi o órgão com maior resposta inflamatória, o que está de acordo com a função imune que este órgão desempenha junto ao baço em peixes adultos, produzindo linfócitos B e T assim como a medula o faz em mamíferos (Trede et al., 2004).

Considerando o papel da adenosina na modulação da inflamação, a avaliação da atividade e expressão da ecto-5'-nucleotidase após exposição ao LPS apresentou um aumento da atividade enzimática mas, não da expressão em coração de *zebrafish* após 24 hpi de LPS. Sabe-se que a ecto-5'-nucleotidase pode promover mecanismos anti-inflamatórios através do controle dos níveis de adenosina (Fredholm et al., 2001), tal alteração pode estar relacionada com a resolução da inflamação no coração, visto que a expressão de *tnf- $\alpha$*  reduziu após 24 hpi. A ativação de receptores A<sub>2A</sub> é conhecida por inibir o processo inflamatório ao atenuar a liberação de citocinas



pró-inflamatórias, embora, nos demais tecidos avaliados este ajuste na produção de adenosina possa ser diferenciado.

Como observado no Capítulo 3 realizamos análises funcionais em animais submetidos à inflamação. Para a obtenção de imagens em  $\mu$ PET realizamos diversas padronizações, tais como: o tempo para imobilização, o tempo de imobilização e o tempo de recuperação do animal na anestesia, bem como, o tempo de biodistribuição do radiofármaco com o auxílio do *Gamma counter* e do  $\mu$ CT .

A biodistribuição do  $^{18}\text{F}$ -FDG analisada no  $\mu$ PET/CT demonstrou que após a injeção intraperitoneal, o radiofármaco se acumulou na parte inferior do animal, próxima ao local da injeção. Aproximadamente 20 minutos após a administração, o radiofármaco se difundiu até a área encefálica, o que apresenta vantagem em relação a modelos animais como o rato, onde a distribuição do  $^{18}\text{F}$ -FDG na região cerebral leva cerca de 40 minutos (Schiffer et al., 2007). Estudos com roedores comprovam que a via de administração intravenosa, inicialmente, promove biodistribuição mais rápida do  $^{18}\text{F}$ -FDG do que a administração intraperitoneal, mas ao final de 40 minutos alcançam perfis similares (Shiffer et al 2006).

A análise de biodistribuição do  $^{18}\text{F}$ -FDG através da quantificação de radiação nos tecidos do *zebrafish* demonstrou que a partir de 30 minutos após a injeção houve uma diminuição dos níveis de radiação na maioria das amostras teciduais estudadas, exceto nos rins e no sangue. Nos rins, observou-se que a radiação aumenta em 30 minutos e depois diminui, o que provavelmente está relacionado com a função de excreção deste órgão (Qiao et al. 2007). A elevação da radiação nas amostras de sangue aos 60 minutos deve estar relacionada ao fato da injeção intraperitoneal proporcionar uma demora no alcance do radiofármaco não metabolizado aos vasos sanguíneos de grande porte.

No Capítulo 3, a avaliação da resposta inflamatória através das imagens em  $\mu$ PET e da quantificação dos níveis teciduais de  $^{18}\text{F}$ -FDG através do *Gamma Counter* não foi capaz de detectar alterações na captação do radiofármaco nos animais submetidos ao LPS. Estudos que registram a captação de radiofármacos mais específicos para as células imunes podem ser melhores marcadores para o estudo da inflamação, como o  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-etanercept que permite a avaliação da expressão de TNF- $\alpha$ . Em estudos com roedores, após a indução da inflamação foi encontrado um aumento da captação de  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-etanercept na região lesionada em uma resposta aguda e não na crônica (Cao et al., 2007), o que está de acordo com o observado no modelo de inflamação utilizado neste estudo, o qual foi capaz de induzir a elevação da expressão do *tnf- $\alpha$*  (Capítulo 2).

Mais estudos devem ser realizados para a aprimorar uso do modelo animal *zebrafish* em tecnologias da Medicina Nuclear, em especial em imagens com  $\mu$ PET, através do teste de outros parâmetros com a obtenção de imagens simultâneas com  $\mu$ PET/CT ou  $\mu$ PET/MRI, bem como, a avaliação de outros radiofármacos mais específicos para o estudo da inflamação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI K, et al. Lipopolysaccharide-activated dendritic cells: "exhausted" or alert and waiting? *J Immunol.* Jun 15;188(12):5981-9, 2012.

ANTONIOLI L, et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov Today.* S1359-6446(14)00072-5, 2014.

ARAÚJO, E. B.; et al. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Centro de Radiofarmácia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN v. 44, n. 1, 2008.*

BEYER, T., et al. A combined PET/CT scanner for clinical oncology. *J Nucl Med v. 41, n. 8, p. 1369-1379, 2000.*

BOEHMLER W, et al. Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns.* 9(3):144-51, 2009.

BOISON D. Adenosine augmentation therapy for epilepsy. *Epilepsia.* 51:97. 2012.

BOURS MJ, et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 112:358-404, 2006.

BROWNING ZS, et al. Using PET/CT imaging to characterize 18 F-fluorodeoxyglucose utilization in fish. *J Fish Dis.* Nov;36(11):911-9, 2013.

BURNSTOCK G, et al., Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* 240:31-304, 2004.

BURNSTOCK G. Purinergic nerves. *Pharmacol Ver.* 24(3):509-81,1972.

BURNSTOCK G. Purinergic receptors. *J Theor Biol.* 21;62(2):491-503, 1976.

BURNSTOCK G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 7: 575-590, 2008.

CAO Q, et al. 2007. PET imaging of acute and chronic inflammation in living mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Nov;34(11):1832-42, 2007.

CAPRIOTTI KM. et al. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol*. v. 33, n. 6, p. 680-5, 2011.

CHEKENI, F. B. et al. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467, 863–867, 2010.

CHENG, K. C. et al. Whole-animal imaging, gene function, and the Zebrafish Phenome Project. *Curr Opin Genet Dev* v.21, p.5 p. 620-629, 2011.

CONDIE, R.M., et al.. Effect of meningococcal endotoxin on the immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90, 355–360, 1968.

EGAN RJ et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*. Dec 14;205(1):38-44, 2009.

ELSINGA, et al. Trends on the Role of PET in Drug Development. 1° ed. University of Groningen, The Netherlands: World Scientific,. 768p., 2012.

ELTZSCHIG, H. K. et al. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ. Res.* 99, 1100–1108, 2006.

ELTZSCHIG, H. K., et al. Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: functional consequences at the vascular interface. *Trends Cardiovasc. Med.* 18, 103–107, 2008.

ENTOK E et al.. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Nigella sativa* L.: (18)FDG-PET imaging of inflammation. *Mol Biol Rep*. 41(5):2827-34, 2014.

FRANCO R, et al. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol. Rev.* p. 27–42., 1998.

FREDHOLM, B.B., et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 53, 527–52, 2001.

GALLAGHER BM, et al Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-Dglucose. *J Nucl Med*;19(10):1154-61, 1978.

GOLDSMITH P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr. Opin. Pharmacol.* v. 5, n. 5, p. 504-12, 2004.

GONÇALVES AF, The inhibitory effect of environmental ammonia on *Danio rerio* LPS induced acute phase response. *JMDev Comp Immunol.* 36(2):279-88, 2012.

GROSSMAN L, et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res.* Dec 25;214(2):277-84, 2010.

GYONEVA S et al. Systemic inflammation regulates microglial responses to tissue damage in vivo. *Glia.* Aug;62(8):1345-60, 2014.

HASKÓ G, CRONSTEIN B. Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol.* Apr 8;4:85, 2013.

HASKÓ, G. et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 759–770, 2008.

HIMER L et al Adenosine A2A receptor activation protects CD4+ T lymphocytes against activation-induced cell death. *FASEB J.* Aug;24(8):2631-40, 2010.

HIRSCHHORN R and RATECH H. Isozymes of adenosine deaminase. *Isozymes Curr Top Biol Med Res.*;4:131–157, 1980.

HOWE K et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.*, 496(7446):498-503, 2013.

JACOBS, A. H., et al. PET-based molecular imaging in neuroscience. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* v.30, n. 7, p. 1051-1065, 2003.

JAULT C, et al. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Mol Immunol.* Jan;40(11):759-71, 2004.

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 201–212, 2011.

KABLI S, et al., In vivo magnetic resonance imaging to detect malignant melanoma in adult zebrafish. *Zebrafish.* 7(2):143-8, 2010.

KABLI S., et al. Magnetic resonance microscopy of the adult zebrafish. *Zebrafish.* v.3, n. 4, p. 431-9, 2006.

KARA FM, Adenosine A1 receptors (A1Rs) play a critical role in osteoclast formation and function. *FASEB J.* Jul;24(7):2325-33, 2010.

KARLOVICH C. A. Characterization of the Huntington's disease (HD) gene homologue in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene.* n. 14, v. 217(1-2), p. 117-25, 1998.

KERSEMANS, V., et al. Micro-CT for anatomic referencing in PET and SPECT: radiation dose, biologic damage, and image quality. *J Nucl Med* v. 52, n. 11: p. 1827-1833, 2011.

KHALIL, M. M. Positron emission tomography (PET): Basic principles. In M. M. Khalil (Ed.), *Basic sciences of nuclear medicine* (pp. 179-213). Heidelberg, Germany: Springer, 2011.

KISS A, et al. Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. *Biochem J.* Dec 1;352 Pt 2:363-72, 2000.

KOBA, W.; FINE E., A novel fish imaging aquarium for small animal research *J Nucl Med.* 51 (Supplement 2):191, 2010.

LEE Y, et al. Improvement of pentylenetetrazol-induced learning deficits by valproic acid in the adult zebrafish. *Eur J Pharmacol.* Sep 25;643(2-3):225-31, 2010.

LEE, C. M.; FARDE L.. Using positron emission tomography to facilitate CNS drug development. *Trends Pharmacol Sci* v.27, n.6, p. 310-316, 2006.

LEITE CE, et al. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. *Toxicol Appl Pharmacol.* Nov 1;272(3):681-9, 2013.

LEITE CE, al. Analytical method for determination of nitric oxide in zebrafish larvae: toxicological and pharmacological applications. *Anal Biochem.* Feb 15;421(2):534-40, 2012.

LONGHI MS, et al. S. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *Mol Med (Berl).* 91(2):165-72, 2013.

LÓPEZ-CASTEJÓN G et al.Characterization of ATP-gated P2X7 receptors in fish provides new insights into the mechanism of release of the leaderless cytokine interleukin-1 beta. *Mol Immunol.* 44(6):1286-99. 2007.

LOYNES CA et al., Pivotal Advance: Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. *J Leukoc Biol.* 87(2):203-12, 2010.

MEIJER AH, et al. (2004) Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Mol Immunol.* Jan;40(11):773-83, 2004.

MENG F, and LOWELL CA Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med.* May 5;185(9):1661-70, 1997.

MENKE AL, et al. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol Pathol.* Aug;39(5):759-75, 2011.

MOCHIZUKI T, et al. FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models. *J Nucl Med*; 42: 1551–1555, 2001.

MURTHA JM, al. Hematologic and serum biochemical values for zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Med.* ;53:37–41, 2003.

NOVITSKIY SV, Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood.* Sep 1;112(5):1822-31, 2008.

NOVOA B, et al. LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* Feb;26(2):326-31, 2009.

RALEVIC V, BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.*; 50: 413-492, 1998.

RICO EP, et al. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* 73(16):2071-82, 2003.

RITMAN E. L. Small-animal CT – its difference from, and impact on, clinical CT. *Nucl Instrum Meth Phys Res A* n. 580, v. 2, p. 968–970, 2007.

ROBSON SC., The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2: 409-430, 2006.

ROMANOWSKA M, et al. Adenosine ecto-deaminase (ecto-ADA) from porcine cerebral cortex synaptic membrane. *Brain Res.*;1156:1–8, 2007.

ROSEMBERG DB, et al. Adenosine deaminase-related genes: molecular identification, tissue expression pattern and truncated alternative splice isoform in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* 81(21-22):1526-34, 2007.

ROWLAND, D. J.; CHERRY S. R.. Small-animal preclinical nuclear medicine instrumentation and methodology." *Semin Nucl Med* v. 38 n. 3, p. 209-222, 2008.



SAHA G. B. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 5<sup>o</sup> ed. New York: Springer,. 393p, 2010.

SAZE Z, et al. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood* 122(1):9–18, 2013.

SCHIEPERS C. Diagnostic Nuclear Medicine 2<sup>o</sup>ed. Germany: Springer 355p, 2006.

SCHIFFER WK, et al. 2007 Optimizing experimental protocols for quantitative behavioral imaging with 18F-FDG in rodents. *J Nucl Med.* Feb;48(2):277-87, 2007.

SCHIFFER WK, et al. Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant. *J Neurosci Methods.* Sep 15;155(2):272-84, 2006.

SEIBT KJ, et al. Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicol In Vitro.* Feb;23(1):78-82, 2009.

SENGER MR, et al. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 139(2):203-7, 2004.

SENGER MR, et al. Exposure to Hg<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology.* Sep 21;226(2-3):229-37, 2006.

SIGNORE A. and GLAUDEMANS A. W. J. M., “The molecular imaging approach to image infections and inflammation by nuclear medicine techniques,” *Annals of Nuclear Medicine*, vol. 25, no. 10, pp. 681–700, 2011.

SILVERMAN M, et al. Specificity of monosaccharide transport in dog kidney. *Am J Physiol*;218(3):743-50, 1970.

SMITH MD et al. Acetate supplementation modulates brain adenosine metabolizing enzymes and adenosine A2A receptor levels in rats subjected to neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* Jun 4;11:99, 2014.

SPENCE R, et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biol. Rev. n.83, p. 13–34, 2008.

TOWNSEND, D. W. Physical principles and technology of clinical PET imaging." Ann Acad Med Singapore v. 33, n. 2, p. 133-145, 2004.

TRAUTMANN, A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a ‘danger signal’. Sci. Signal. 2, pe6, 2009.

TUIN A, et al., On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 290(2):G377-85, 2006.

VAIDYANATHAN S, et al. FDG PET/CT in infection and inflammation--current and emerging clinical applications. Clin Radiol. Jul;70(7):787-800, 2015.

VALLABHAJOSULA S., Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009.

VOJTECH LN. Host immune response and acute disease in a zebrafish model of *Francisella* pathogenesis. Infect Immun. 77(2):914-25, 2009.

VUADEN FC, et al. Adenosine A(2A) receptor agonist (CGS-21680) prevents endotoxin-induced effects on nucleotidase activities in mouse lymphocytes. Eur J Pharmacol. Jan 25;651(1-3):212-7, 2011.

WARD JL et al. Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. J Biol Chem. Mar 24;275(12):8375-81, 2000.

WU C et al. PET imaging of inflammation biomarker. Theranostics. 2013 Jun 24;3(7):448-66, 2013.

YANG J et al. Adenosine increases LPS-induced nuclear factor kappa B activation in smooth muscle cells via an intracellular mechanism and modulates it via actions on adenosine receptors. *Acta Physiol (Oxf)*. Mar;210(3):590-9, 2014.

YANG LL et al. Endotoxin Molecule Lipopolysaccharide-Induced Zebrafish Inflammation Model: A Novel Screening Method for Anti-Inflammatory Drugs Molecules, 19, 2390-2409, 2014.

YAO SY, et al. Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues. *J Biol Chem*. Nov 7;272(45):28423-30, 1997.

ZAVIALOV A V, and ENGSTRÖM A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J*.391:51–7, 2005.

ZIMMERMANN H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res*.. p. 44–56, 2001.

ZIMMERMANN H. Purinergic signaling in neural development. *Semin Cell Dev Biol*.; 22: 194-204, 2011.

ZON LI, PETERSON RT: In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*. 2005, 4(1):35-44, 2005.

## ANEXOS

### PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 27/2015 - CEUA

Porto Alegre, 27 de março de 2015.

Senhor(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais informa que apreciou e aprovou sua solicitação datada de 11 de março de 2015, referente ao acréscimo de 286 animais para execução do projeto de pesquisa 14/00417, intitulado: **"Adaptação do zebrafish ao MicroPET/CT: Avaliação de imagens para o estudo do papel do sistema purinérgico no contexto da inflamação"**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. João-Batista Blessmann Weber  
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.  
Profa. Dra. Rosane Souza da Silva  
Faculdade de Biociências  
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512  
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS  
Fone: (51) 3353-6365  
E-mail: ceua@pucrs.br



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 93/2014 - CEUA

Porto Alegre, 28 de novembro de 2014.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

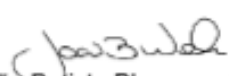
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 14/00417, intitulado "**Adaptação do zebrafish ao MicroPET/CT: Avaliação de imagens para o estudo do papel do sistema purinérgico no contexto da inflamação**".

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

| Nº de Animais | Espécie     | Duração do Projeto |
|---------------|-------------|--------------------|
| 200           | Danio rerio | 11/2014 – 11/2016  |

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber  
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Rosane Souza da Silva

FABIO

Nesta Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512  
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS  
Fone: (51) 3353-6365  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)