Robert Honorato Fraga Carvalho

**Imagem PET de processos relacionados à esclerose múltipla -
Estudo pré-clínico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia
Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Dra. Daniele de Paula Faria

São Paulo

2018

Robert Honorato Fraga Carvalho

**Imagem PET de processos relacionados à esclerose múltipla -
Estudo pré-clínico**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Daniele de Paula Faria

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Robert Honorato Fraga
Imagem PET de processos relacionados à esclerose
múltipla : estudo pré-clínico / Robert Honorato
Fraga Carvalho. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Daniele de Paula Faria.

Descritores: 1.Esclerose múltipla
2.Encefalomyelite experimental autoimune
3.Lisofosfatidilcolinas 4.Tomografia por emissão de
pósitrons 5. PK11195 6.[11C]PIB

USP/FM/DBD-259/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Agradecimentos

Gostaria primeiramente agradecer a Deus pela força dada ao longo desta trajetória.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado.

A Dra. Daniele de Paula Faria que foi minha grande mentora e sempre me transmitiu seus conhecimentos e proporcionou meu aprendizado sempre da melhor forma e a quem sempre serei grato.

A Dra. Caroline Real Gregório, que esteve ao meu lado transmitindo seus conhecimentos ao longo deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Buchpiguél que sempre incentivou e contribuiu com este trabalho.

Ao Alexandre Teles Garcez que me transmitiu conhecimentos sobre aquisição de imagem e auxílio no manuseio do PET voltado para pequenos animais.

Ao Dr. Fábio Luiz Navarro Marques por transmitir seus conhecimentos ao longo desta jornada.

A Camila de Godoi Carneiro que contribuiu com as aquisições das imagens deste trabalho.

As colaboradoras do LIM 43 Josy e Marluce que sempre estiveram à disposição dentro do laboratório.

Aos colaboradores do LIM 43 André e Cida que ajudaram no tratamento dos animais.

Ao Cinrad-HCFMUSP e seus colaboradores com a disponibilização da estrutura física e auxílio na produção dos radiofármacos e controle de qualidade.

Ao LIM 21, em especial ao Fábio Duran, que contribuiu para um melhor resultado na quantificação das imagens.

Ao Prof. Luiz Roberto Giorgetti de Britto e ao seu auxiliar Adilson da Silva Alves que abriram as portas do Instituto de Ciências Biomédicas e apoio nos testes *in vitro*.

A bióloga Simone Cinini que participou deste trabalho como responsável pelos primatas não humanos.

Ao laboratório de primatas não humanos da UNIFESP, em especial ao auxiliar Júnior, que ajudou no tratamento dos saguis.

A GE, General Eletric Healthcare, pelo financiamento do projeto.

E a todos que contribuíram de forma direta e indiretamente com este trabalho.

Lista de Figuras

Figura 1- Imagem de ressonância magnética de lesões típicas da esclerose múltipla no cérebro e medula espinhal, indicadas com setas. As imagens axiais mostram lesões periventriculares (A) com realce de uma lesão (B), lesões justacorticais (C) e lesões infratentoriais (D).....	8
Figura 2 - Esquema de emissão e aniquilação de pósitrons e detecção pelo equipamento PET.....	9
Figura 3 - Mecanismos da neurodegeneração e os alvos utilizados na imagem molecular e estudos metabólicos na esclerose múltipla.....	10
Figura 4 - Esquema do processo de captação do radiofármaco [^{11}C]PK11195 pela proteína translocadora 18 kDa presente na mitocôndria das células microgliais ativadas	11
Figura 5 - Estrutura química e aplicação do [^{11}C]PK11195.....	12
Figura 6 - Estrutura química e aplicação do radiofármaco [^{11}C]PIB	13
Figura 7 - Imagem de tomografia por emissão de pósitrons com o radiofármaco [^{11}C]PIB em pacientes com esclerose múltipla.....	14
Figura 8 - Etapas do desenvolvimento dos processos de neuroinflamação e desmielinização em modelos de EAE	20
Figura 9 - Módulo de síntese utilizado na produção dos radiofármacos marcados com carbono-11 no ciclotron do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InRad-HCFMUSP)	28
Figura 10 - Esquema para a produção do [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195.....	28
Figura 11 - Atlas estereotático de rato ilustrando as coordenadas utilizadas para injeção da lisolecitina	35
Figura 12 - Rato Wistar anestesiado posicionado em aparelho estereotático para início de procedimento de injeção de lisolecitina nas regiões de corpo caloso e estriado.	36
Figura 13 - Preparo da emulsão para a realização de procedimento de imunização nos saguis, onde a emulsão foi mantida em agitação, por barra magnética, em banho de gelo. Círculo vermelho indica frasco com emulsão. .	37
Figura 14 - Imagem do sagui durante processo de imunização.....	38

Figura 15 - Desenho experimental mostrando os tempos onde a aquisição das imagens com os radiofármacos [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195 foram realizadas. ...	40
Figura 16 - Desenho experimental indicando os dias em que ocorreram os processos de aquisição de imagem PET com os radiofármacos [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195, processos de imunização e reimunização, eutanásia dos animais e imagem de RM.....	41
Figura 17 - Esquematização dos procedimentos realizados no preparo das lâminas para a coloração histoquímica com <i>luxol fast blue</i>	44
Figura 18 - Esquema das etapas realizadas no processo histológico de coloração com <i>luxol fast blue</i>	45
Figura 19 – Gráficos obtidos para a curva de calibração dos radiofármacos [^{11}C]PIB (A) e [^{11}C]PK11195 (B).....	47
Figura 20 - Progressão da doença através de avaliação dos sinais clínicos (escore)	51
Figura 21 – Comparação do número de reimunizações necessárias ao longo do período experimental entre os grupos MOG/IFA e MOG/CFA	52
Figura 22 - Evolução do peso de cada animal durante o experimento.....	53
Figura 23 – Variação, em porcentagem, do peso final dos animais dos grupos MOG/IFA e MOG/CFA comparado com o peso inicial dos mesmos.	53
Figura 24 - Imagens ilustrativas de PET [^{11}C]PK11195 fusionadas com <i>template</i> de RM.....	55
Figura 25 - Imagens ilustrativas de PET [^{11}C]PIB fusionadas com <i>template</i> de ressonância magnética (RM).....	56
Figura 26 - Quantificação da captação dos radiofármacos [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB para a relação entre a lesão e o lado contralateral nas regiões do corpo caloso e estriado	58
Figura 27 - Imagens PET com o radiofármaco [^{11}C]PIB de diferentes regiões do encéfalo de sagui	59
Figura 28 - Imagens PET com [^{11}C]PK11195 em diferentes regiões do encéfalo de sagui.....	60
Figura 29 - Relação entre a captação do cérebro total e região de captação inespecífica (músculo externo da cabeça) com os radiofármacos [^{11}C]PIB e	

[¹¹ C]PK11195 em modelo de EAE em primatas não humanos imunizados com MOG/IFA e MOG/CFA.	61
Figura 30 - Relação de captação entre as regiões do esplênio do corpo caloso direito com o músculo da cabeça para o grupo MOG/IFA com o radiofármaco [¹¹ C]PIB	65
Figura 31 - Razão de captação entre o globo pálido direito e captação inespecífica, músculo da cabeça no grupo MOG/IFA para [¹¹ C]PIB	65
Figura 32 - Quantificação dos radiofármacos [¹¹ C]PIB na região do núcleo caudado inferior direito em modelos de EAE em saguis imunizados com MOG/IFA	66
Figura 33 - Razão de captação entre o córtex cingulado anterior e captação inespecífica do músculo da cabeça no grupo MOG/IFA para o radiofármaco [¹¹ C]PIB	67
Figura 34 – Regiões com redução na captação do radiofármaco [¹¹ C]PK11195 no ponto intermediário dos animais do grupo MOG/IFA	68
Figura 35 - Razão de captação entre a região do córtex motor esquerdo e captação inespecífica nos grupos MOG/IFA e MOG/CFA para o [¹¹ C]PIB	71
Figura 36 - Histoquímica comparando o hemisfério experimental e hemisfério controle	72
Figura 37 - Correlação entre a razão dos valores do hemisfério experimental pelo hemisfério controle da imagem final de [¹¹ C]PK11195 com os valores obtidos na mesma região no ensaio de imuno-histoquímica, Iba-1 e GFAP, no modelo de lisolecitina em ratos	73
Figura 38 - Imagem ilustrativa de imuno-histoquímica com Iba-1 em saguis ...	74
Figura 39 - Correlação entre captação de [¹¹ C]PK11195 e os dados da imuno-histoquímica adquiridos com os saguis dos grupos MOG/IFA e MOG/CFA	75
Figura 40 - Comparação do hemisfério controle com o hemisfério experimental utilizando a coloração <i>luxol fast blue</i>	76
Figura 41 - Correlação entre a captação do radiofármaco [¹¹ C]PIB com a análise histológica do corpo caloso e do estriado em modelo de rato com lisolecitina	77
Figura 42 - Imagem ilustrativa da alteração da mielina nas regiões do globo pálido (A), núcleo caudado (B), corpo caloso (C), córtex cingulado (D) e córtex	

motor (E) do encéfalo de sagui através da técnica de <i>luxol fast blue</i> nos grupos de MOG/IFA e MOG/CFA.....	78
Figura 43 - Histologia com <i>luxol fast blue</i> indicando regiões desmielinizadas que não deram resultados significativos na quantificação de imagem <i>in vivo</i> com o radiofármaco [^{11}C]PIB em animais dos grupos MOG/IFA e MOG/CFA. 79	
Figura 44 - Correlação entre o radiofármaco [^{11}C]PIB e a histologia com <i>luxol fast blue</i> em encéfalo modelos de EAE em saguis	80
Figura 45 - Autorradiografia de cortes coronais de cérebro de rato com o radiofármaco ^{11}C -PIB	80
Figura 46 - Imagens de autorradiografia de encéfalo de sagui com o radiofármaco [^{11}C]PIB.	81
Figura 47 - Imagens de autorradiografia do encéfalo de sagui com o radiofármaco [^{11}C]PK11195	82
Figura 48 - Fusão de RM e PET do cérebro de rato mostrando as ROIs desenhadas nas três posições anatômicas para quantificação do corpo caloso lateralmente.....	100
Figura 49 - Fusão de RM e PET de cérebro de rato mostrando as ROIs desenhadas nas três posições anatômicas para a quantificação da lesão de região do corpo caloso e estriado	100
Figura 50 - Imagem de ressonância magnética de cérebro de sagui com o desenho da ROI utilizada para a quantificação do cérebro total.	101
Figura 51 - Região de captação inespecífica utilizada para a normalização das imagens de PET realizadas com os saguis dos grupos MOG/IFA e MOG/CFA.	101
Figura 52 - Regiões de interesse utilizadas para uma análise específica das regiões cerebrais dos saguis desenhadas a partir de dados de atlas estereotático.....	102

LISTA DE ABREVIações

µL – microlitro

µm – micrometro

ABC – complexo avidina-biotina-peroxidase

AgOTf – Triflato de prata

BPRC – Biomedical Primate Research Centre

Br₂ – Bromo

BTA – Benzotiazol

CEUA – Comitê de Ética em Uso de Animais

CFA – Adjuvante Completo de Freund

CIS – Síndrome clinicamente isolada

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

DAB – Diaminobenzidina

DAB – Diamobenzidina

DMSO – Dimetilsulfoxido

EAE – Encefalite autoimune experimental

EM – Esclerose múltipla

EMPP – Esclerose múltipla primariamente progressiva

EMRR – Esclerose múltipla remitente-recorrente

EMSP – Esclerose múltipla secundariamente progressiva

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

g – grama

GBq – Gigabecquerel

GFAP – Anticorpo primário contra a proteína ácida fibrilar glial

HPLC – *High performance liquid chromatography*

Iba-1 – Molécula adaptada ligante de cálcio ionizado-1

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais

IFA – Adjuvante Incompleto de Freund

InRAD-HCFMUSP – Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

keV – quilo elétron-volt

KOH – Hidróxido de Potássio

LCR – Líquido cefalorraquidiano
LFB – luxol fast blue
LIM 43 – Laboratório de Medicina Nuclear
mCi – milicurie
mg – miligrama
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
min – Minuto
mL – mililitro
MOG – Glicoproteína de mielina de oligodendrócitos
NaI – Iodeto de Sódio
L – Litro
PBS - Solução salina tamponada com fosfato
PET – Tomografia por emissão de pósitrons
PFA – Paraformaldeído
pH – Potencial de hidrogênio
PIB – Composto B de Pittsburgh
PTS – Portable test system
rhMOG – Glicoproteína de mielina de oligodendrócitos recombinante humana
RM – Ressonância magnética
RMN – Ressonância magnética nuclear
ROI – Região de interesse
SMA – SP – Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo
SNC – Sistema nervoso central
TMEV – Vírus de encefalomielite murinho de Theiler
TSB – Trypticase Soy Broth (Caldo Soja Trypticaseína)
TSPO – Proteína translocadora 18 kDa
UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

Resumo

Introdução: Esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante e inflamatória do sistema nervoso central. Seu diagnóstico é clínico, auxiliado pela imagem de ressonância magnética, mas essa imagem não diferencia processos de inflamação e desmielinização. A tomografia por emissão de pósitrons (PET), usando radiofármacos específicos, pode ser uma ferramenta para diferenciar esses processos. O radiofármaco [^{11}C]PK11195 se liga na proteína translocadora 18 kDa (TSPO) presente nas mitocôndrias das células gliais. O radiofármaco [^{11}C]PIB é utilizado para detecção de placa β -amiloide, mas tem sido utilizado também na análise do conteúdo de mielina. Esta nova aplicação foi fundamentada na captação deste radiofármaco em substância branca. A utilização em conjunto destes dois radiofármacos pode diferenciar processos de neuroinflamação, desmielinização e remielização através da imagem PET. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho é validar o uso dos radiofármacos [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB para estudo pré-clínico para a quantificação de neuroinflamação e quantidade de mielina, respectivamente, na progressão da doença de modelos animais de esclerose múltipla, modelo de roedores, e em seguida realizar análise de lesões em substância cinzenta e substância branca em modelo de primatas não humanos. **Material e Métodos** Projeto aprovado pelo comitê de ética (UNIFESP 2628300415 e FMUSP 25/15 e 0556/15). O modelo de lisolecitina em ratos (Wistar, machos) foi induzido pela injeção estereotáxica de lisolecitina 1% em dois locais do estriado direito ($2 + 2 \mu\text{L}$) e no corpo caloso ($3 \mu\text{L}$). As imagens de PET com [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB foram adquiridas nos tempos basal, 3 dias, 1 semana e 4 semanas após a administração estereotáxica. O modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) em saguis foi induzido por injeção de glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG) emulsificada em Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) ou em Adjuvante Completo de Freund (CFA). As imagens de PET foram adquiridas antes da imunização (basal) e ± 100 dias após a imunização (final). O tecido cerebral foi utilizado para análise imuno-histológica. **Resultados:** No modelo de lisolecitina em rato foi observado um aumento na captação de [^{11}C]PK11145 no corpo caloso, 25 % ($P = 0,002$) e no estriado, 24 % ($P < 0,05$) uma semana após a imunização comparando com a imagem basal. Com o [^{11}C]PIB não foram observadas diferenças significativas. No modelo de EAE em saguis, induzido com MOG/IFA, foi possível observar uma redução significativa da captação de [^{11}C]PIB nas regiões do esplênio do corpo caloso direito de 38,17 % ($P = 0,0365$), globo pálido direito, 22,75 %, ($P = 0,0355$), núcleo caudado direito, 29,36 % ($P = 0,0284$) e córtex cingulado, 18,99 % ($P = 0,0453$), enquanto para o grupo MOG/CFA foi observada uma redução significativa para a região do córtex motor esquerdo, 9,51 % ($P = 0,0083$). Com o [^{11}C]PK11195 foi observada uma redução significativa na captação do radiofármacos na imagem intermediária do grupo MOG/IFA comparada com a captação basal nas regiões do córtex somatossensorial direito, 22,8 % ($P = 0,0041$), córtex de associação direito, 18,98 % ($P = 0,0228$), córtex subpial direito, 23,37 % ($P = 0,0006$) e região do núcleo caudado inferior esquerdo, 18,97 % ($P = 0,0233$). Nos ensaios *post mortem* realizados com os ratos foi possível observar na imuno-histoquímica uma correlação, entre micróglia ativada (Iba-1) e [^{11}C]PK11195, tanto no corpo caloso como no estriado. Para os saguis foi observado correlação entre [^{11}C]PK11195 e Iba-1 e esta não foi observada para o [^{11}C]PK11195 e GFAP. Na histologia, foi observada uma correlação entre os dados da imagem de [^{11}C]PIB e a técnica de *luxol fast blue*. **Conclusão:** A imagem PET com [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB foi eficiente para as quantificações de neuroinflamação e mielina, respectivamente, na progressão da doença dos modelos animais (roedor e primata não humano) da EM.

Esclerose múltipla; Encefalomielite experimental autoimune; lisolecitina; Imagem PET; [^{11}C]PK11195; [^{11}C]PIB.

Abstract

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating and inflammatory disease of the central nervous system. Its diagnosis is clinical, helped by magnetic resonance imaging, but this image modality does not differentiate between inflammation and demyelination. Positron Emission Tomography (PET), using specific radiopharmaceuticals, can be a tool to differentiate these processes. The radiopharmaceutical [^{11}C]PK11195 binds to the translocator protein 18 kDa (TSPO) present in the mitochondria of glial cells. [^{11}C]PIB is a radiopharmaceutical used for detection of β -amyloid plaques, but has also been used in the analysis of myelin content. This new application was based on the white matter uptake of this radiopharmaceutical. The use of these two radiopharmaceuticals together can differentiate processes of neuroinflammation, demyelination and remyelination by the PET imaging. **Objective:** The objective of this work is to validate the use of tracers [^{11}C]PK11195 and [^{11}C]PIB for preclinical study for the qualification of neuroinflammation and amount of myelin, respectively, in the disease progression of animal models of multiple sclerosis, rodent model, and then perform analysis of grey matter and white matter lesions in non-human primate model. **Material and Methods:** Project approved by the ethics committee (UNIFESP 2628300415 and FMUSP 25/15 and 0556/15). The rat lysolecithin model (Wistar, male) was induced by stereotactic injection of lysolecithin 1% at two sites of the right striatum ($2 + 2 \mu\text{L}$) and in the corpus callosum ($3 \mu\text{L}$). PET images with [^{11}C]PK11195 and [^{11}C]PIB were acquired at baseline, 3 days, 1 week and 4 weeks after stereotactic injection. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model in marmosets was induced by injection of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) emulsified in Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) or Complete Freund's Adjuvant (CFA). PET images were acquired prior to immunization (baseline) and ± 100 days after immunization (end of experiment). Brain tissue was used for immunohistochemical analysis. **Results:** In the rat lysolecithin model, an increase in [^{11}C]PK11145 uptake of 25% ($P = 0.002$) was observed in the corpus callosum and 24% ($P < 0.05$) in the striatum, one week after immunization compared to the baseline image. The IFA/MOG and CFA/MOG groups showed clinical signs in 100% of the animals. The comparison between baseline and symptoms time points showed in the CFA/MOG group a significant ^{11}C -PIB uptake reduction only in the left motor cortex, 9.5 % ($P = 0.0083$). For the IFA/MOG group, a significant decrease in ^{11}C -PIB uptake was observed in the splenium of corpus callosum, 38.4 % ($P = 0.0365$), globus pallidus, 22.9 % ($P = 0.0355$) and tail of caudate nucleus, 28.9 % ($P = 0.0284$), being these 3 regions in the right brain hemisphere, and also in the cingulate cortex (midline above corpus callosum), 19.5 % ($P = 0.0453$). ^{11}C -PK11195 uptake was significantly decreased in IFA/MOG group in the intermediary time point in the right somatosensorial cortex, 22.08 % ($P = 0.0041$), right association cortex, 18.98 % ($P = 0.0228$), right subpial cortex, 23.37 % ($P = 0.0006$) and left tail of caudate nucleus, 18.97 % ($P = 0.0233$). In the post mortem analysis performed with rat tissue, a weak correlation between activated microglia (Iba-1) and [^{11}C]PK11195 uptake was observed both in the corpus callosum and in the striatum. For the marmosets we observed correlation between [^{11}C]PK11195 and Iba-1 but we didn't observed between [^{11}C]PK11195 and GFAP. In histology, we observed correlation between [^{11}C]PIB and luxol fast blue. **Conclusion:** The PET images with [^{11}C]PK11195 and [^{11}C]PIB were efficient for quantifying neuroinflammation and myelin content, respectively, in the disease progression of animal models (rodent and nonhuman primate) of MS.

Multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; lysolecithin; PET imaging; [^{11}C]PK11195; [^{11}C]PIB.

Normalização Adotada

Neste trabalho foi adotado como normalização as regras de Vancouver, autor data.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Esclerose Múltipla.....	1
1.2. Imagem em Esclerose Múltipla.....	7
1.2.1. Imagem PET de neuroinflamação.....	10
1.2.2. Imagem PET de mielina.....	12
1.3. Modelos animais.....	15
1.3.1. Modelos Virais.....	15
1.3.2. Modelos de desmielinização induzidos por toxinas.....	16
1.3.3. EAE (<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>).....	18
2. Objetivo.....	22
2.1. Geral.....	22
2.2. Específico.....	22
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1. Materiais.....	23
3.1.1. Produção dos radiofármacos [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195.....	23
3.1.2. Cirurgia estereotáxica.....	24
3.1.3. Imunização dos saguis.....	24
3.1.4. Aquisição de imagem.....	24
3.1.5. Quantificação de imagem.....	24
3.1.6. Imuno-histoquímica.....	24
3.1.7. <i>Luxol Fast Blue</i>	25
3.1.8. Autorradiografia.....	26
3.2. Métodos.....	27
3.2.1. Síntese dos radiofármacos.....	27
3.2.1.1. [^{11}C]PK11195.....	29

3.2.1.2.	Controle de Qualidade	30
3.2.1.3.1	Controle visual	30
3.2.1.3.2.	Determinação do potencial de hidrogênio (pH)	31
3.2.1.3.3.	Pureza química.....	31
3.2.1.3.4.	Pureza radioquímica.....	31
3.2.1.3.5.	Determinação da atividade específica	31
3.2.1.3.6.	Solventes residuais.....	32
3.2.1.3.7.	Identidade radionuclídica.....	32
3.2.1.3.8.	Pureza radionuclídica	33
3.2.1.3.9.	Endotoxinas.....	33
3.2.1.3.10.	Esterilidade.....	33
3.2.1.3.11.	Validação do processo de produção	34
3.2.2.	Indução dos modelos animais.....	34
3.2.2.3.	Lisolecitina em ratos	34
3.2.2.4.	EAE (<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>).....	36
3.2.3.	Imagem molecular.....	39
3.2.3.3.	Lisolecitina em ratos	39
3.2.3.4.	EAE em saguis	40
3.2.4.	Imuno-histoquímica.....	42
3.2.5.	Análise histológica.....	43
3.2.6.	Autorradiografia <i>in vitro</i>	46
3.2.7.	Análise estatística	46
4.	Resultados.....	47
4.2.	Síntese e controle de qualidade dos radiofármacos	47
4.3.	Controle de Qualidade	47
4.3.1.	Controle visual	47
4.3.2.	Determinação do potencial de hidrogênio (pH)	48

4.3.3.	Pureza química	48
4.3.4.	Pureza radioquímica	48
4.3.5.	Determinação da atividade específica.....	48
4.3.6.	Solventes residuais	48
4.3.7.	Identidade radionuclídica	49
4.3.8.	Pureza radionuclídica.....	49
4.3.9.	Endotoxinas	49
4.3.10.	Esterilidade	49
4.4.	Modelo Animal	50
4.4.1.	Lisolecitina em Ratos	50
4.4.2.	Modelo EAE em sagui.....	51
4.5.	Imagem molecular	54
4.5.1.	Lisolecitina em ratos.....	54
4.5.2.	EAE em sagui	58
4.6.	Imuno-histoquímica	71
4.6.1.	Ratos.....	71
4.6.2.	Saguis	73
4.7.	Análise histológica	75
4.7.1.	Rato.....	75
4.7.2.	Sagui	77
4.8.	Autorradiografia <i>in vitro</i>	80
4.8.1.	Ratos.....	80
4.8.2.	Saguis	81
5.	Discussão	83
5.1.	Produção dos Radiofármacos	83
5.2.	Modelo de Lisolecitina em ratos	83
5.3.	Encefalomielite autoimune experimental em saguis	85

6. Conclusão.....	92
Referências bibliográficas	93
Anexos	100

1. Introdução

1.1. Esclerose Múltipla

O sistema nervoso central (SNC) pode ser considerado um órgão “imuno-privilegiado”, pois comporta uma numerosa população de células mielóides e barreiras defensivas, por exemplo, meninges, espaço perivascular e o plexo coróide. Em seu estado estacionário, as populações de células mielóides são representadas pela micróglia parenquimatosa e macrófagos não parenquimatosos. A micróglia é uma população única de macrófagos presentes no tecido do SNC e estão principalmente envolvidos em reações imunes e doenças inflamatórias. O processo de neuroinflamação envolve uma resposta coordenada entre a micróglia e outras células do SNC, entre elas os astrócitos e células imunitárias periféricas que migram para o SNC. O processo de neuroinflamação pode ocorrer devido a diversos estímulos, por exemplo, toxinas, infecções, traumas, entre outros. Este processo pode ocorrer de forma aguda, caracterizada por microgliose e liberação de mediadores inflamatórios, e de forma crônica, quando o processo não é regulado, e este pode levar a uma neurodegeneração e consequentemente a diversos distúrbios, por exemplo, a esclerose múltipla (EM) (Mammana et al., 2018).

Para uma rápida propagação do impulso no sistema nervoso, os vertebrados possuem um isolamento dos axônios que é realizado pela mielina. Este isolamento glial de múltiplas camadas, embainhamento, possui a capacidade de reduzir a capacitância transversal e aumentar a resistência da membrana plasmática axonal, assim, a mielina fornece uma base estrutural para a propagação do potencial de ação saltatória que acelera a condução nervosa em 20 a 100 vezes quando comparada com axônios não mielinizados de mesmo diâmetro. As células gliais responsáveis pelo processo de mielinização são as células de Schwann e os oligodendrócitos (NAVE; WERNER, 2014).

A esclerose múltipla é uma doença desmielinizante e inflamatória do sistema nervoso central. EM é uma das doenças neurológicas que mais causa

disfunções em jovens e adultos, sendo os sintomas manifestados nas idades entre 20 e 40 anos, com maior prevalência em mulheres. A maior prevalência desta doença está na Europa (80 para 100.000 habitantes) seguida do Mediterrâneo Oriental (14,9 para 100.000 habitantes) e Américas (8,3 para 100.000 habitantes) (Zuccolotto, 2016).

No Brasil, segundo revisão realizada por Pereira et al. (2015) existe uma variação na prevalência de acordo com a região, sendo que a maior taxa foi vista para o estado do Rio Grande do Sul, 27,2/100.000 habitantes e a menor para o estado do Pernambuco, 1,36/100.000 habitantes. No estado de São Paulo, região do país de maior densidade populacional, a incidência registrada é de aproximadamente 15/100.000 habitantes.

A determinação causal da esclerose múltipla possui três fatores que exercem um papel importante e potencialmente interagem como fatores de risco: o ambiental, o genético e o epigenético. Dentre os fatores ambientais existem alguns que são conhecidos por possuírem um papel no desenvolvimento da EM, entre eles estão a deficiência de vitamina D, tabagismo, dieta e obesidade no início da vida, sendo que, os dois primeiros são considerados os principais (Thompson et al., 2018).

O que determina o fator genético ter um importante papel dentro do desenvolvimento da EM é o aumento da probabilidade dentro da hereditariedade familiar e a redução do desenvolvimento da EM ser diretamente proporcional aos riscos com o grau de parentesco (Thompson et al., 2018).

Entre os fatores da epigenética o que se destaca é que os portadores do alelo HLA DRB1 possuem uma probabilidade de adquirir esta doença três vezes maior que os que não são portadores (Thompson et al., 2018).

Os sintomas mais comuns desta doença são: paralisia, dormência ou fraqueza em um ou mais membros, disfunção renal, disartria, ataxia e tremor, neurite óptica, neuralgia trigeminal, intolerância ao calor, fadiga, tontura, falta de sono, dor, dificuldades cognitivas e depressão (Miljković D, 2013).

A característica patológica da esclerose múltipla é a formação de lesões desmielinizadas, denominadas de placas escleróticas, no sistema nervoso central. As lesões são consequência de um complexo processo que envolve

inflamação, desmielinização e remielinização, diminuição dos oligodendrócitos, astrócitos e degeneração neuronal e axial. As lesões podem ocorrer em todo o sistema nervoso central, mas o nervo óptico, tronco cerebral, cerebelo e medula espinhal são os locais mais relatados clinicamente (Lassmann, 2013; McDonald, 1999).

Na esclerose múltipla, o agente etiológico e sua patogênese não estão totalmente estabelecidos, mas já foram realizados diversos estudos tanto para sua definição quanto para sua classificação. No ano de 1952 foi publicado por Adams e Kubik uma classificação que foi utilizada por muitos anos (Adams; Kubik, 1952). Após um maior entendimento sobre esta doença, a EM foi classificada como 1) remitente-recorrente (EMRR), 2) primariamente progressiva (EMPP) e 3) secundariamente progressiva (EMSP). Dentro desta classificação era levado em consideração que a maioria dos casos iniciava-se com quadros de EMRR com ocorrências de 1 ou 2 surtos ao ano, podendo ou não ficar com acúmulo de sintomas do surto e tendo uma redução da sua frequência com o passar do tempo. Cerca de 10 anos após o início da doença, 50% dos pacientes progridem para a EMSP, onde ocorre um acúmulo contínuo dos sintomas podendo ter, ou não, recorrências e destes pacientes, 90% possuem idade acima de 25 anos. A EMPP apresenta-se mais tardiamente com prevalência maior em homens (Mahad; Trapp; Lassmann, 2015; Cabreira; Ceccibini, 2006).

A classificação da esclerose múltipla utilizada desde 1952 definia bem o curso clínico dos pacientes com esta doença, porém não fornecia informação temporal sobre o processo e atividade da doença em curso. Na tentativa de resolver esta questão, novos subtipos da doença e novas definições de curso da EM foram publicados em 2016 onde a classificação mudou para síndrome clinicamente isolada (CIS), doença remitente recorrente (EMRR), doença progressiva desde o início (EMPP) ou após um curso recidivante inicial (EMSP) (Ntranos; Lublin, 2016). A tabela 1 mostra a nova classificação e o modificador do curso da EM, onde a atividade é determinada por recaídas clínicas e / ou atividade de ressonância magnética (lesões que aumentam o contraste; lesões em T2 novas e inequivocamente aumentadas) avaliadas pelo menos anualmente e sua progressão é medida pela avaliação clínica, ao menos uma

vez ao ano. Caso não estejam disponíveis as avaliações, a atividade e a progressão são “indeterminadas”.

Tabela 1 - Classificação de 2016 da esclerose múltipla onde é levado em consideração os fenótipos da doença e seus modificadores do curso clínico – adaptado (Ntranos; Lublin, 2016).

Fenótipos do curso clínico da esclerose múltipla	Modificador do curso da esclerose múltipla
Síndrome clinicamente isolada (CIS)	→ Não Ativo → Ativo
Doença remitente-recorrente (EMRR)	→ Não Ativo → Ativo
Doença progressiva seja desde o início (EMPP) ou após um curso redicivante inicial (EMSP)	→ Não ativo e sem progressão (estável) → Não está ativo, mas com progressão → Ativo, mas sem progressão → Ativo com progressão

EMPP = Esclerose múltipla primariamente progressiva, EMSP = Esclerose múltipla secundariamente progressiva

O diagnóstico da esclerose múltipla é clínico, realizado através de testes confirmatórios e exclusões diagnósticas.

Inicialmente, a determinação desta doença foi protocolada por Charcot e Marburg nos anos de 1868 e 1936 respectivamente, onde o primeiro considerava o nistagmo, tremor não intencional e perda da fala, como a tríade para o diagnóstico, e o segundo utilizava os sinais de Uhtoff, ausência de reflexos abdominais e sinais do trato piramidal, porém sabe-se hoje que estas duas tríades podem ocorrer em outras doenças neuronais. Atualmente, os critérios utilizados para a confirmação deste quadro são os de McDonald, que foram revisados pela última vez no ano de 2017 que buscou simplificar e esclarecer diversos pontos presentes na versão anterior, a de 2010, que apresentou em seu ano como uma mudança das anteriores a inclusão do

exame de ressonância magnética. A partir de então, as imagens de ressonância magnética têm sido utilizadas de forma rotineira para determinar e decidir quanto ao tratamento adotado. Portanto, este método consegue auxiliar no diagnóstico e realizar o acompanhamento do quadro dos pacientes (Thompson et al., 2018; Gafson, 2012; Files Dk,2015). A tabela 2 mostra os critérios de McDonald 2017 para a realização do diagnóstico da esclerose múltipla.

Tabela 2 - Critérios de McDonald 2017 para o diagnóstico de esclerose múltipla em pacientes com surtos iniciais, onde é levado em consideração o número de surtos, número de lesões com evidência clínica e as necessidades de exames complementares – adaptada (Thompson et al., 2018).

	Número de lesões com evidência clínica objetiva	Necessidade de dados adicionais para diagnóstico da esclerose múltipla
≥ 2 surtos clínicos	≥ 2	Nenhum*
≥ 2 surtos clínicos	1 (bem como histórico claro de um surto anterior envolvendo uma lesão em um local anatômico distinto)	Nenhum*
≥ 2 surtos clínicos	1	Dispersão de lesão no espaço demonstrada por um surto clínico adicional que implica um sítio no SNC diferente ou por imagem de ressonância magnética
1 surto clínico	≥ 2	Dispersão de lesão no tempo demonstrado por um surto clínico adicional ou por imagem de ressonância magnética ou demonstração em bandas oligoclonais específicas de líquido cefalorraquidiano
1 surto clínico	1	Dispersão de lesão no espaço demonstrada por um surto clínico adicional que implica um sítio no SNC diferente ou por imagem de ressonância magnética E Dispersão de lesão no tempo demonstrado por um surto clínico adicional ou por imagem de ressonância magnética ou demonstração em bandas oligoclonais específicas de líquido cefalorraquidiano

* Não são necessários testes adicionais para demonstrar a disseminação no espaço e no tempo. No entanto, a menos que a ressonância magnética não seja possível, a ressonância magnética nuclear (RMN) cranioencefálica deve ser obtida em todos os pacientes nos quais o diagnóstico de esclerose múltipla está sendo considerado. Além disso, a ressonância magnética ou exame de líquido cefalorraquidiano na medula espinhal devem ser considerados em pacientes com evidências clínicas e de ressonância magnética insuficientes que suportem a esclerose múltipla, como uma apresentação diferente de uma síndrome clinicamente isolada típica ou com características atípicas. Se exames de imagem ou outros testes (por exemplo, LCR) forem negativos, é preciso ter cuidado antes de diagnosticar esclerose múltipla, e diagnósticos alternativos devem ser considerados.

A esclerose múltipla não possui cura, porém existem algumas opções de tratamento para diminuir o número de crises e deixá-las mais suaves. A terapia mais utilizada é a administração de glicocorticóides conforme levantado por Moreira e colaboradores (2002), que mostrou que mesmo com a ausência de

trabalhos comparativos entre doses e vias de administração, a utilização de altas dosagens de metilprednisolona intravenosa tem se tornado a terapia preferencialmente utilizada em surtos da doença. Este mesmo levantamento mostra a utilização de interferon beta (Betaferon[®]) e interferon alfa (Rebif[®]) em tratamento de quadros da esclerose múltipla remitente recorrente, esclerose múltipla secundariamente progressiva e em tratamento prévio de pacientes com alto risco de desenvolvimento de esclerose múltipla.

1.2. Imagem em Esclerose Múltipla

A formação da imagem de ressonância magnética (RM) utiliza como princípio a análise das propriedades magnéticas dos átomos de hidrogênio em seres vivos e a sua interação com o campo magnético externo e ondas de rádio. Estas ondas de rádio alteram o alinhamento da magnetização do hidrogênio presente no corpo e assim produzem sinais de ressonância magnética induzidos pelo aparelho. A RM possui como objetivo analisar estrutura anatômica através da análise do núcleo do hidrogênio na molécula de água, resultando em uma imagem estrutural e com alta resolução espacial (Anavarapu; Kathi; Vadla, 2018).

Apesar da alta sensibilidade e alta resolução, o exame de ressonância magnética apresenta limitações (Milo, 2014). A imagem de ressonância magnética mostra alterações do conteúdo de água, e isso pode estar relacionado aos processos inflamatório, desmielinização ou remielinização, portanto, comprometendo a diferenciação destes processos. A figura 1 mostra uma imagem de ressonância magnética de lesões típicas de EM no cérebro e na medula espinhal (Brownlee et al., 2016).

Figura 1- Imagem de ressonância magnética de lesões típicas da esclerose múltipla no cérebro e medula espinhal, indicadas com setas. As imagens axiais mostram lesões periventriculares (A) com realce de uma lesão (B), lesões justacorticais (C) e lesões infratentoriais (D). Varredura sagital (E, F) e axial (G, H) e lesões da medula espinhal cervical mostrando aumento de contraste em F e H (Brownlee et al., 2016).

A técnica de ressonância magnética é um método robusto para o diagnóstico e monitoramento da esclerose múltipla, porém, na tentativa de solucionar a lacuna de especificidade deste método, estão sendo testados alguns radiofármacos para utilização em imagem PET (*Positron Emission Tomography*).

A imagem de PET vem se mostrando uma ferramenta promissora para elucidação dos mecanismos e para acompanhamento da evolução temporal da neuroinflamação, degeneração axonal e reparos neuronais (Kiferle et al., 2011). Além disso, as imagens de PET podem permitir a investigação de terapias em potencial, tanto para estudos clínicos quanto para estudos pré-clínicos (Kiferle et al., 2011).

PET é uma técnica de imagem funcional não invasiva com alta sensibilidade e boa resolução. Uma vantagem desta técnica é sua capacidade

de fornecer informações quantitativas em processos fisiológicos, bioquímicos e farmacológicos *in vivo* sem interferir no sistema. Isto ocorre uma vez que os radiofármacos são utilizados em baixa concentração, pico molar, denominada de quantidade traço. O radiofármaco injetado emite pósitrons (antimatéria dos elétrons) que são aniquilados ao encontrar elétrons presentes no tecido. A aniquilação gera a emissão de dois raios gama de 511 keV de energia em sentidos opostos e estes são detectados pelo anel (360°) de detectores do equipamento PET formando uma imagem tridimensional (Zibo Li, 2010). A figura 2 ilustra o processo de preparação do radiofármaco, aquisição da imagem, com a emissão e aniquilação do pósitron e a sua detecção pelo equipamento PET e o processo de geração de imagem.

Figura 2 - Esquema de emissão e aniquilação de pósitrons e detecção pelo equipamento PET- adaptado (De Paula Faria et. al., 2014).

Radiofármacos marcados com os radionuclídeos $[^{18}\text{F}]$ flúor e $[^{11}\text{C}]$ carbono são importantes nos estudos de neurociências, pois permitem a ligação em receptores e/ou processos moleculares específicos, como ocorre para o $[^{11}\text{C}]$ Raclopride, $[^{18}\text{F}]$ DOPA, $[^{11}\text{C}]$ PK11195, $[^{11}\text{C}]$ PIB, $[^{18}\text{F}]/[^{11}\text{C}]$ Flumazenil, entre outros.

No âmbito que tange a esclerose múltipla estão sendo utilizados diversos radiofármacos para avaliar a evolução da doença, como é o caso dos

radiofármacos utilizados para avaliação da ativação de astrócitos, [^{11}C]Acetato, avaliação de dano neural, [^{11}C]Flumazenil, avaliação de processos inflamatórios, [^{11}C]PK11195, processos de desmielinização, [^{11}C]PIB, entre outros (Moccia; Ciccarelli, 2017). Na figura 3 são apresentados os mecanismos da neurodegeneração e os alvos da imagem molecular e de estudos metabólicos no processo da esclerose múltipla.

Figura 3 - Mecanismos da neurodegeneração e os alvos utilizados na imagem molecular e estudos metabólicos na esclerose múltipla - Adaptada (Moccia; Ciccarelli, 2017).

1.2.1. Imagem PET de neuroinflamação

O processo de ativação, alterações funcionais e morfológicas da micróglia estão associados aos processos de expressão e superexpressão de receptores, o que abre possibilidades na imagem molecular com PET com novos radiofármacos para o processo de avaliação da neuroinflamação. Atualmente, a maioria dos radiofármacos PET utilizados em seres humanos utiliza como alvo a superexpressão da proteína translocadora 18 kDa (TSPO). Esta proteína está presente de forma natural na membrana mitocondrial

externa e apresenta um aumento de expressão durante o período de ativação microglial, sendo assim, um marco sensível na neuroinflamação. Uma série de radiofármacos foi desenvolvida visando a micróglia ativada, porém, o [^{11}C]PK11195 é o mais validado e adotado em estudos em seres humanos e modelos animais (Cerami; Iaccarino; Perani, 2017).

O radiofármaco [^{11}C]PK11195 possui uma seletividade por proteína translocadora (TSPO) presente na micróglia, imunócitos presentes no cérebro. Essas proteínas são reguladas positivamente nas mitocôndrias das células microgliais durante processo inflamatório no cérebro. Assim, este radiofármaco pode auxiliar na detecção de neuroinflamação, conforme ilustrado na figura 4. A avaliação do processo inflamatório com [^{11}C]PK11195 é empregada em processos neurodegenerativos, quadros de isquemia, esclerose múltipla, entre outros (Debruyne, 2003).

Figura 4 - Esquema do processo de captação do radiofármaco [^{11}C]PK11195 pela proteína translocadora 18 kDa presente na mitocôndria das células microgliais ativadas – adaptada (Venetì; Lopresti; Wiley, 2012).

Nas figuras 5A e 5B são apresentados, respectivamente, a estrutura química do [^{11}C]PK11195 e uma imagem da captação deste radiofármaco em cérebro de rato com neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo industrial em estudo longitudinal.

Figura 5 - Estrutura química e aplicação do $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$. A) Estrutura química do $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ mostrando a localização do átomo radioativo (carbono-11), este indicado pela seta vermelha (Vas et al., 2008). B) Imagem PET em diferentes tempos (6 h, 1, 3, 7 e 14 dias) de processo inflamatório induzido em cérebro de rato com lipopolissacarídeo industrial (Shukuri et al., 2011).

1.2.2. Imagem PET de mielina

Tioflavina T é um corante fluorescente benzotiazol catiônico bem definido como um marcador na detecção de fibrilas amiloide, sua intensidade é significativamente aumentada quando esta se liga a estruturas β em agregados fibrilares (Dasgupta; Kishore, 2017).

No ano de 2001, Mathis et. al. apresentaram diversos análogos da tioflavina T como agentes de imagem amiloide, em particular um derivado marcado com carbono 11, o 2-(4'-metilaminofenil)benzotiazol (BTA-1), que posteriormente foi derivado em um estudo para N-metil- $[^{11}\text{C}]2$ -(4-metilaminofenil)-6-hidroxibenzotiazol e foi dado o nome Composto B de

Pittsburgh (*Pittsburgh Compound B*), ou simplesmente PIB (Vallabhajosula, 2011).

O radiofármaco [^{11}C]PIB tem sido utilizado em humanos desde 2004 (Klunk et. al., 2004), com sucesso, como um radiofármaco PET para identificação de placas β -amilóides depositadas no cérebro. O composto mostrou-se específico para a ligação à proteína β -amilóide, e tem sido possível associar a taxa de ligação com o desenvolvimento da doença de Alzheimer.

Na figura 6A é mostrada a estrutura química do [^{11}C]PIB, enquanto a figura 6B ilustra a primeira imagem de [^{11}C]PIB comparando sua captação em um indivíduo controle saudável e um paciente com doença de Alzheimer (Nelissen, 2009; Dasgupta; Kishore, 2017; Fodero-Tavoletti, 2009).

Figura 6 - Estrutura química e aplicação do radiofármaco [^{11}C]PIB. A) Fórmula estrutural do [^{11}C]PIB indicando a localização do isótopo radioativo carbono-11, seta vermelha (Nelissen, 2009). B) Imagens PET com [^{11}C]PIB em idoso saudável e idoso com a Doença de Alzheimer, mostrando diferentes padrões de captação, indicado por seta branca. Legenda: Control= controle, AD= Doença de Alzheimer (Cohen; Klunk, 2014).

No ano de 2011, o radiofármaco [^{11}C]PIB foi utilizado pela primeira vez na análise do conteúdo de mielina, em pacientes com EM (figura 7) (Stankoff et. al. 2011). Em seguida, estudos em modelos animais desta mesma doença também foram feitos [De Paula Faria et al. (2014), Yang et al. (2015), Huang et al.(2017)] onde esta nova aplicação foi fundamentada pela captação em substância branca característica deste radiofármaco.

Figura 7 - Imagem de tomografia por emissão de pósitrons com o radiofármaco [^{11}C]PIB em pacientes com esclerose múltipla. Paciente 1 de A – C, Paciente 2 de D – G. As setas mostram placas escleróticas enquanto as pontas de seta apontam para estruturas de substância cinzenta, ambos os casos apresentam perda de captação em imagem PET (Stankoff et. al., 2011).

Os radiofármacos citados ([^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB) estão sendo utilizados no exterior há vários anos, porém para estas moléculas serem marcadas com isótopos e usadas em seres humanos no Brasil são necessários

testes pré-clínicos para a confirmação de sua segurança (ANVISA, 2009). No caso da esclerose múltipla existem diversos modelos experimentais que possibilitam seu estudo, a escolha de um dependerá diretamente da hipótese científica em questão.

1.3. Modelos animais

Com a complexidade e heterogeneidade da esclerose múltipla, juntamente com as limitações de realização de determinados estudos em humanos, como biópsias e autopsias, os modelos animais acabam se tornando ferramentas indispensáveis para os diversos estudos realizados, principalmente sobre os mecanismos patogênicos.

As principais características da esclerose múltipla são inflamação e desmielinização, além disso, ativação de astrócitos e micróglia, apoptose de oligodendrócitos e perda axonal são achados no sistema nervoso central afetado. Diferentes tipos de células que participam do processo de desmielinização e remielinização presentes na esclerose múltipla foram descobertos através de modelos animais, embora nenhum modelo reproduza completamente a esclerose múltipla (Bjelobaba et al., 2018).

Nas últimas décadas têm sido desenvolvidos diferentes modelos animais para o estudo dos mecanismos da doença e para a realização das avaliações de estratégias terapêuticas, assim, conseguindo replicar a heterogeneidade da EM e, portanto, são considerados adequados para a realização de estudos sobre sua patogênese. Nos dias atuais, estes modelos podem ser divididos em três grandes grupos: 1) modelos virais, normalmente induzidos pela infecção por vírus de encefalomielite murino de Theiler (TMEV); 2) modelos de desmielinização induzidos por toxinas e 3) encefalomielite autoimune experimental (EAE) (Denic et al., 2011; Lassmann, 2007).

1.3.1. Modelos Virais

Dentre os modelos animais de esclerose múltipla induzidos por vírus, o mais utilizado é o modelo de infecção por vírus da encefalomielite murina de

Theiler (TMEV). Este vírus é uma monocamada de RNA viral pertencente a família dos *picornaviridae* e sua identificação ocorreu primeiramente por Max Theiler (1934) através da paralisia e encefalomielite causada em camundongos (DePaula-Silva et al., 2017).

A indução de TMEV pode ocorrer de duas maneiras distintas, a primeira através de vírus altamente neurovirulento, que causa uma encefalomielite fatal, morte entre uma e duas semanas, e a segunda com vírus de baixa neurovirulência, que induz uma infecção bifásica em camundongos. A primeira fase desta indução consiste em uma poliomielite durante o processo de replicação viral na substância cinzenta do sistema nervoso central, porém os níveis virais serão reduzidos a quase zero após duas semanas de indução. Já a segunda fase é caracterizada por infecção persistente associada com inflamação no sistema nervoso central e desmielinização (Procaccini et al., 2015).

O processo de remielinização neste tipo de indução é escasso em determinados tipos de camundongos e a evolução do quadro da doença dependerá do tipo de camundongo escolhido, que também determinará a progressão da mesma, danos axonal e atrofia da medula espinal (Kipp et al., 2012).

1.3.2. Modelos de desmielinização induzidos por toxinas

Duas toxinas amplamente utilizadas para a indução de desmielinização em animais são a lisolecitina e a cuprizona (Denic et al., 2011).

Lisolecitina é uma substância tóxica que causa focos de desmielinização no tecido por mecanismos que são independentes das células T. O mecanismo é através da perda focal dos oligodendrócitos, assim, não atingindo o axônio e causando inflamação. Sua ação é detergente sobre a bainha de mielina e induz uma alta resposta local de macrófagos resultando no aumento de inflamação e consequente desmielinização. Após a degradação da lisolecitina é iniciado o processo de remielinização no local (Rinaldi et al., 2016; Bondan et al., 2004).

Após quatro dias da injeção de lisolecitina é possível visualizar desmielinização na área injetada, sendo o pico de perda de mielina observado 7-8 dias após a injeção. Após dez dias da cirurgia, o processo de remielinização da substância branca já pode ser observado e após quatro semanas a remielinização é quase completa. Devido à rapidez nas alterações de conteúdo de mielina nas lesões induzidas, este modelo é considerado interessante por permitir avaliar os processos de desmielinização e remielinização em um mesmo modelo e em um curto período de tempo (Rawji; Yong, 2013).

Comparado com outros modelos induzidos por toxinas, lisolecitina é o modelo que apresenta o processo de remielinização mais rápido, pois as células progenitoras de oligodendrócitos não são afetadas. Assim, após a completa remoção dos restos de mielina, os axônios são remielinizados principalmente pelos oligodendrócitos, no entanto, dependendo do tamanho da lesão as células de Schwann também podem participar do processo de remielinização (Bjelobaba et. al., 2018).

A cuprizona, ácido oxálico bis (ciclohexilideno hidrazida), quelante de cobre, é uma toxina que causa dano na mielina e suas características variam de acordo com a espécie animal utilizada no experimento. Quando camundongos, ratos e cobaias são expostos a esta toxina, eles desenvolvem encefalopatia espongiiforme, no entanto, os ratos, diferentemente dos camundongos, não desenvolvem uma desmielinização clara, sendo assim, as características adquiridas da doença irão depender, além da espécie utilizada, da concentração administrada da droga e da idade dos animais. Para os modelos mais utilizados com cuprizona, adição de 0,2% da toxina na dieta de camundongos jovens adultos, leva a desmielinização de várias estruturas de substância branca no cérebro, dentre eles, cerebelo, corpo caloso, cápsula interna, comissura anterior e substância branca talâmica. O alvo da cuprizona são os oligodendrócitos maduros, sendo que as demais células não são afetadas por ela. Após a remoção da toxina da dieta dos animais é possível observar uma extensa remielinização dentro de 3 a 4 semanas, porém se for mantida a administração de cuprizona na dieta de forma contínua, o processo de desmielinização torna-se persistente. Este modelo é considerado

interessante para avaliação de ensaios terapêuticos com o objetivo de reprimir a desmielinização ou de acelerar a remielinização na esclerose múltipla (Denic et al., 2011; Torkildsen et al., 2008; Sachs et al., 2014).

1.3.3. EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

O modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) foi descoberto em 1930 por Rivers et. al. na tentativa de demonstrar a etiologia das complicações neurológicas consequentes das vacinas antirrábicas e seu trabalho foi inspirado por achados preliminares de paralisias fatais ocorridos por tratamentos com esta mesma vacina (Van Epps, 2005). Para replicação do modelo, a doença desmielinizante e inflamatória foi induzida em macacos Rhesus, realizando a imunização através de emulsão estéril de cérebros saudáveis de coelhos, levando a destruição da mielina no cérebro e medula espinhal em 75% dos animais (Denic et al., 2011).

Após este trabalho, a indução de EAE passou a ser realizada por emulsões utilizando adjuvantes adicionados a emulsões de cérebro, medula espinhal homogeneizada, preparações de mielina ou proteínas de mielina purificadas. Desde os experimentos iniciais, este modelo vem sendo utilizado em diversos animais, por exemplo, camundongos, ratos, porcos, coelhos, bodes, ovelhas, saguis e macacos (Denic et al., 2011).

O modelo EAE apresenta muitas das características clínicas e histológicas da esclerose múltipla, tanto no cérebro quanto na medula espinhal, incluindo locais de inflamação, desmielinização, disfunção da barreira hematoencefálica, infiltração de células mononucleares e sinal de bloqueio de condução, resultando no comprometimento da neurotransmissão. Dentre estas semelhanças destacam-se a suscetibilidade genética, forte associação com o MHC II (complexo principal de histocompatibilidade classe II), maior incidência no sexo feminino, infecção precoce, quadro patológico na substância branca, envolvimento de macrófagos e micróglias, degeneração axonal, sinais clínicos, neurites óticas, mielites, entre outros (Steinman; Zamvil, 2005).

Para a indução de EAE em saguis podem ser utilizadas três metodologias diferentes: injeção de mielina, proteínas de mielina ou peptídeos

de mielina. O protocolo para a imunização mais utilizado e estabelecido é a utilização de injeção intradérmica com glicoproteína da mielina do oligodendrócito humano recombinante (rhMOG-125) ou peptídeo de glicoproteína de mielina de oligodendrócitos humano sintético referente ao amino ácido 34 – 56 (MOG 34-56) emulsificado com o adjuvante incompleto de Freund (IFA) ou com o adjuvante completo de Freund (CFA), assim, a escolha adequada do adjuvante dependerá diretamente da hipótese científica do trabalho (Jagessar et al., 2010).

Os adjuvantes IFA e CFA possuem diferenças imunológicas no processo de desenvolvimento da encefalomielite autoimune. Um estudo conduzido por Hart, Gran e Weissert (2011) mostrou que a emulsão MOG/IFA ativou as seguintes fenotipagens de células T *in vivo*, CD3 + CD56 + CD16- e CD4 simples ou CD4 / 8 duplamente positivas, além da produção de altos níveis de IL-17A coletada de órgãos linfóides durante o período de indução do modelo, enquanto que IFN- γ , citocina característica do modelo direcionado por Th1 foi indetectável. O mesmo estudo mostra que as lesões causadas pela emulsão de CFA são formadas por células Th1 e/ou Th17, que induzem o processo inflamatório enquanto os autoanticorpos levam a desmielinização através da opsonização da mielina, por exemplo, epítopos do antígeno promove a fagocitose da mielina, desencadeando citotoxicidade mediada por complemento e/ou macrófagos. A figura 8 mostra a diferença de ação das emulsões contendo CFA e IFA.

Figura 8 - Etapas do desenvolvimento dos processos de neuroinflamação e desmielinização em modelos de EAE. A) Cascata do antígeno MOG emulsionado com Adjuvante Completo de Freund. B) Cascata do antígeno MOG emulsionado com Adjuvante Incompleto de Freund. Legenda: APC = célula apresentadora de antígeno; CLT = Linfócito T citotóxico; DC = células dendríticas; M ϕ = macrófago; ROS = espécie reativa a oxigênio; Th17 = célula T helper 17; TLR = receptor toll-like (Hart; Gran; Weissert, 2011 – ADAPTADO).

Comparando os dois adjuvantes de indução da EAE, o CFA é considerado uma ferramenta mais poderosa do que o IFA, porém possui algumas desvantagens, entre elas a indução de granulomas em locais de inoculação e órgãos, especialmente fígado e pulmão, ocasionando desconforto ao animal, aumento de órgãos linfóides, disfunção hematopoiética, ruptura da arquitetura dos linfonodos e forte efeito imuno-estimulador sistêmico. Esses efeitos são atribuídos à presença de micobactérias no adjuvante, o que pode sobrecarregar mecanismos suaves e reguladores imunológicos, como por exemplo, causar distorção Th1 das reações celulares autoimunes (Jagessar, 2010).

A escolha do modelo animal deve ser minuciosa em cada estudo, pois as características de cada modelo implicam diretamente nos resultados.

Os estudos que utilizam imagens *in vivo* não invasivas, como a imagem PET, podem fornecer informações importantes da progressão da doença ou resposta terapêutica, pois possibilitam a realização de várias imagens no mesmo animal (estudo longitudinal).

A limitação das imagens *in vivo*, no geral, é a baixa resolução em comparação as análises *in vitro*, como histologia e imuno-histoquímica. No caso da imagem PET, o uso de animais com o cérebro muito pequeno, como os camundongos, pode dificultar a identificação de algumas alterações por falta de resolução dos equipamentos, mesmo os dedicados a pequenos animais. Por isso, em estudos de neuroimagem com PET, a escolha do modelo animal deve também levar em consideração as características técnicas dos equipamentos, além da característica de cada modelo.

Buscando uma melhor elucidação para os processos envolvidos na progressão da esclerose múltipla, foram utilizados neste estudo, dois modelos animais com diferentes progressões da doença em diferentes espécies, onde foram avaliados longitudinalmente tanto a neuroinflamação quanto o conteúdo de mielina em roedor e primata não humano, utilizando imagem PET.

2. Objetivo

2.1. Geral

O objetivo deste trabalho é validar o uso dos radiofármacos [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB para estudo pré-clínico para a quantificação de neuroinflamação e quantidade de mielina, respectivamente, na progressão da doença de modelos animais de esclerose múltipla, modelo de roedores, e em seguida realizar análise de lesões em substância cinzenta e substância branca em modelo de primatas não humanos.

2.2. Específico

- 1) Validar o uso dos radiofármacos [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195 produzidos na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).
- 2) Estabelecer protocolo de imagem PET em saguis em equipamento dedicado a pequenos animais presente no laboratório de medicina nuclear (LIM 43) da FMUSP.
- 3) Comparar o modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) em sagui induzidos pelo adjuvante incompleto de Freund (IFA) e adjuvante completo de Freund (CFA).

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Produção dos radiofármacos [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195

- Cíclotron 16,5 MeV – modelo PETtrace880, GE
- *Hotcell* – modelo MIP1-2P-1390, Comecer
- Módulo de carbono-11 (fase gasosa e metilação) – Modular Lab – Eckert&Ziegler
- 6-Benzotiazolol, 2-(4-aminofenil) – ABX Advanced Biochemical Compounds
- (R)-N-Desmetil *PK11195* - ABX Advanced Biochemical Compounds
- Coluna cromatográfica –C18 fase reversa, Luna – Phenomenex
- Coluna cromatográfica μ Bondapak C18 fase reversa (3,9 x 300 mm x 10 μm)
- Novapak C18 fase reversa (150 mm x 3,9 μm)
- Cartucho de separação de amostra - SepPak[®] C18 light - Waters
- Bromo – Sigma-Aldrich
- Triflato de prata – Sigma-Aldrich
- Butanona – Sigma-Aldrich
- Acetonitrila – Sigma-Aldrich
- Hidróxido de potássio - Sigma-Aldrich
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma-Aldrich
- Iodeto de sódio– Sigma-Aldrich
- Ácido clorídrico - Sigma-Aldrich
- Etanol – Sigma-Aldrich
- Calibrador de dose – modelo VDC-505, Veenstra e/ou modelo CRC-25 PET, Capintec
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência – Agilent Technologies

- Detector de radiação – Raytest

3.1.2. Cirurgia estereotáxica

- Lisofosfatidilcolina (L- α -Lisolecitina) – Sigma-Aldrich
- Aparelho estereotáxico manual para pequenos animais - KOPF INSTRUMENTS Model 900
- Seringa de Hamilton® - 10 μ L, Model 701 RN SYR, Small Removable NDL, 32 ga, 2 in, point style 3

3.1.3. Imunização dos saguis

- Mielina de oligodendrócitos recombinante humana (rhMOG) – doação do centro de pesquisa biomédica em primatas da Holanda (*Biomedical Primate Research Centre* (BPRC) – Rijswijk, Netherlands)
- Adjuvante Completo de Freund (CFA) - Sigma-Aldrich
- Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) - Becton, Dickinson and Company

3.1.4. Aquisição de imagem

- Equipamento PET/SPECT/CT para pequenos animais - Triumph™ - Gamma Medica-Ideas, Northridge, CA, U.S.A.
- Equipamento PET/RM – 3T, Signa GE, Wisconsin, USA

3.1.5. Quantificação de imagem

- Software PMOD® (PMOD Technologies Ltd., Zurich, Switzerland)
- ImageJ – *Image Processing and Analysis in Java*

3.1.6. Imuno-histoquímica

- Micrótomato – modelo SM 2000R, Leica

- Anticorpo primário contra a molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba-1) – Abcam - ab5076
- Anticorpo primário contra a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) - Sigma—Aldrich - G3893
- Anticorpo secundário contra camundongo feito em jumento biotinilado- The jackson Laboratory
- Anticorpo secundário contra cabra feito em jumento biotinilado - The jackson Laboratory
- Soro normal de jumento - The jackson Laboratory
- Triton X-100
- Kit de complexo Avidina-Biotina - VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit (Peroxidase, Standard) - PK-6100
- Solução de diaminobenzidina (DAB) – Sigma--Aldrich
- Peróxido de hidrogênio 30% - Sigma--Aldrich
- Microscópio – modelo Eclipse E1000, Nikon
- Câmera de Captura – modelo DXM1200, Nikon

3.1.7. *Luxol Fast Blue*

- Solvente blue 38 – Sigma-Aldrich
- Solução de paraformaldeído 4 % (PFA) – Sigma-Aldrich
- Etanol Absoluto – Synth
- Ácido acético – Sigma-Aldrich
- Carbonato de lítio - MERK
- Acetado de violeta de cresil - Sigma-Aldrich
- Xilol – Synth
- Solução de Permout® . Fisher Scientific
- Microscópio – Nikon Eclipse E1000
- Câmera de Captura – Nikon DXM1200

3.1.8. Autorradiografia

- Placa de fósforo multi propósito – FUJIFILM Corporation
- Leitor de placa de fósforo – GE Healthcare Life Sciences - Typhoon FLA 9500

3.2. Métodos

3.2.1. Síntese dos radiofármacos

Os radiofármacos [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195 foram produzidos na unidade de produção de radiofármacos (CinRad) do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InRad-HCFMUSP), segundo protocolo validado na instituição e produção automatizada descritos abaixo.

Primeiramente foi realizado a produção do carbono-11 [^{11}C] no ciclotron através da reação nuclear $^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)\rightarrow^{11}\text{C}$, com a aceleração de íon de hidrogênio a 16,5 MeV e bombardeamento do alvo gasoso de [^{14}N]nitrogênio, contendo 2% de oxigênio, o que permitiu obter o produto na forma de dióxido de carbono ([^{11}C]CO₂), o qual foi transferido ao módulo de síntese instalado dentro de uma *hotcell* e controlado automaticamente por *software*. Na figura 9 é apresentado o módulo de síntese instalado dentro da *hotcell*.

A partir deste ponto, as reações para preparação dos radiofármacos tomam caminhos um pouco diferentes, conforme apresentado nos esquemas da figura 10.

Figura 9 - Módulo de síntese utilizado na produção dos radiofármacos marcados com carbono-11 no ciclotron do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InRad-HCFMUSP). **A)** Módulo de fase gasosa. **B)** Módulo utilizado para as fases de marcação e purificação dos produtos.

Figura 10 - Esquema para a produção do $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ e $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$

A coluna de carvão ativado responsável por prender o $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ recebido no módulo de síntese foi aquecida a uma temperatura de 300 °C para que ocorresse o desprendimento do $^{11}\text{CO}_2$ e este fosse encaminhado para um forno de paládio, aquecido a 600 °C e transformado em metano ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$). Em seguida, o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ reagiu com bromo (Br_2), para a formação do brometo de metila ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{Br}$). O $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{Br}$ formado passou por duas colunas de ascarite, para retenção do bromo gasoso e seguiu para uma coluna de triflato de prata (AgOTf), formando o triflato de metila ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$).

O precursor do PIB, 2-(4'-Aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol (6-OH-BTA-0), 1 mg, foi dissolvido em 0,7 mL de butanona e colocado no frasco de reação. O $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ foi transferido na forma de gás para o frasco de reação, até que a máxima atividade radioativa fosse detectada. O frasco reacional foi aquecido a 80 °C, por 90 segundos; depois resfriado a 50 °C e a mistura reacional diluída com água até completar o volume de 2 mL. O volume total do frasco de reação foi injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) e a purificação foi realizada utilizando coluna semi-preparativa Luna C18 (250x10 mm) como fase sólida e acetonitrila:água (43:57) como fase móvel. Foram utilizados fluxo de 5 mL/min da fase móvel, detector de UV em 254 nm e detector de radiação gama em sensibilidade média.

A fração do produto com tempo de retenção entre 10 e 12 minutos foi coletada e diluída em 40 mL de água para injeção; a solução foi passada em cartucho de separação de amostra (SepPak[®] C18 light) e descartada. O $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ retido no cartucho foi eluído com 1 mL de etanol seguido de 10 mL de solução de NaCl 0,9 %.

A atividade radioativa do produto final foi medida em calibrador de dose, e uma etiqueta com as informações do produto (nome do radiofármaco, isótopo, atividade, data e hora) foi impressa e colada no frasco. Uma alíquota de 1 mL foi retirada e enviada para controle de qualidade.

3.2.1.1. $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$

A produção da fase gasosa do $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ foi a mesma utilizada para o $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ com exceção da última etapa onde a coluna utilizada foi de iodeto de sódio (NaI) para a produção de iodeto de metila ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$) em substituição da coluna de AgOTf.

O precursor do PK11195, R-N-desmetil PK11195, 1 mg, foi dissolvido em 0,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e transferido para o frasco de reação juntamente com hidróxido de potássio (KOH), 30 – 35 mg. O $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ transferido na forma gasosa foi borbulhado no frasco de reação até sua total

transferência (atividade máxima). A reação (metilação) foi promovida a 40 °C por 60 segundos. Após o tempo de reação, foi adicionado 1,7 mL de ácido clorídrico 1 M, para diluição e ajuste do pH da mistura reacional, a qual foi injetada em HPLC para purificação. O sistema de purificação utilizou uma coluna semi-preparativa Luna C18 (250 x 10 mm), fase móvel etanol:água (60:40), com fluxo de 5 mL/min e detector de UV, ajustado no comprimento de onda de 254 nm, e detector de radiação gama.

O produto coletado, tempo de retenção entre 9 e 11 minutos, foi diluído em um frasco com 50 mL de água para injeção, em seguida o volume total passou em cartucho de separação de amostra (SepPak® C18 light) e descartada. O produto retido no cartucho foi eluído com 1 mL de etanol seguido de 10 mL de solução de NaCl 0,9 %.

A atividade radioativa do produto final foi medida em calibrador de dose, e uma etiqueta com as informações do produto (nome do radiofármaco, isótopo, atividade, data e hora) foi impressa e colada no frasco. Uma alíquota de 1 mL foi retirada e enviada para controle de qualidade.

3.2.1.2. Controle de Qualidade

Os parâmetros de controle de qualidade avaliados para este composto foram: volume, aspecto visual, pH, pureza química [6-OH-BTA-0 (mg/mL) e impurezas desconhecidas (%)], pureza radioquímica (%), atividade específica (GBq/μmol), solventes residuais [acetonitrila (mg/L), 2-Butanona (mg/mL) e etanol (g/L)], endotoxinas, identidade radionuclídica, pureza radionuclídica e esterilidade.

3.2.1.3.1 Controle visual

O frasco incolor contendo a solução do produto foi colocado atrás de vidro plumbífero e verificado quanto a presença de alguma partícula no interior do frasco, a cor e a transparência do produto final. O volume final foi avaliado utilizando a escala presente no próprio frasco do produto final.

3.2.1.3.2. Determinação do potencial de hidrogênio (pH)

O potencial de hidrogênio da solução do produto obtido foi determinado utilizando fitas para determinação de pH. Soluções tampões nos limites inferior e superior permitidos para o produto foram aplicadas em outras duas fitas e comparadas.

3.2.1.3.3. Pureza química

A pureza química do [^{11}C]PIB foi determinada através da comparação do pico do produto, determinado através da injeção de um padrão, com os demais picos apresentados na injeção.

O mesmo ensaio foi realizado com o padrão do PK11195.

3.2.1.3.4. Pureza radioquímica

A pureza radioquímica foi determinada por injeção de 10 μL da amostra do radiofármaco no HPLC equipado com coluna $\mu\text{Bondapak C18}$ (3,9 x 300 mm x 10 μm) e eluídas com fase móvel acetonitrila:água (45:55), no fluxo de 1 mL/min e detecção da radioatividade em detector de iodeto de sódio (dopado com tálio). A área dos picos observados foram quantificadas utilizando software ProFSA, e os valores apresentados em porcentagem da contagem total.

3.2.1.3.5. Determinação da atividade específica

Para a determinação da atividade específica, foi injetada uma amostra do produto final no HPLC e encontrado o valor referente a massa do produto final, através da curva da calibração, em gramas, em seguida, este valor foi convertido para μmol . Também foi realizada a conversão da atividade final do

produto, de mCi para GBq. Por fim, o valor da atividade, em GBq, foi dividido pela massa, obtendo assim o valor de atividade específica em GBq/ μmol .

3.2.1.3.6. Solventes residuais

Antes da injeção da solução de análise, a coluna do cromatógrafo a gás foi condicionada injetando ar no equipamento e executando o programa de análise, seguido de duas injeções de 1 μL de água. Um microlitro de soluções padrão de etanol 10%, acetonitrila 1% e 2-Butanona 1%, em água, foi injetado em triplicada para estabelecimento dos valores de referência, determinados pela integração da área do pico do sinal. Amostra de 1 μL de [^{11}C]PIB foi injetado e o teor dos solventes residuais determinado a partir da comparação dos valores obtidos na análise com aqueles obtidos na amostra padrão.

No caso do PK11195 as soluções injetadas foram etanol 10% e DMSO 1%, em água.

3.2.1.3.7. Identidade radionuclídica

A identidade radionuclídica do [^{11}C]PIB foi determinada inserindo a amostra radioativa em um calibrador de dose, e a atividade foi medida no tempo zero e cinco minutos após a primeira leitura. Os valores foram aplicados à equação 1, permitindo calcular a meia-vida física do radionuclídeo.

$$A = A_0 \cdot e^{-\lambda t} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

A = Atividade final

A_0 = Atividade inicial

e = Número de Euler (2,718281)

λ = Constante de decaimento ($0,693/t_{1/2}$)

$t_{1/2}$ = tempo de meia-vida física

t = Intervalo de tempo entre medições

O mesmo teste foi realizado para o [^{11}C]PK11195.

3.2.1.3.8. Pureza radionuclídica

O espectro de emissões de radiação gama foi realizado para determinar a pureza radionuclídica da amostra, utilizando um contador multicanal de iodeto de sódio. O equipamento foi calibrado com fontes padrão de $[^{57}\text{Co}]$ cobalto e $[^{137}\text{Cs}]$ césio, 20 minutos antes da análise do produto a ser testado. Uma solução de aproximadamente 1 μL de $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$, diluído em 10 mL de água para injeção, foi colocada no poço de um contador multicanal, a amostra foi contada por 120 segundos, o que permitiu o software *datasource* gerar um gráfico com o espectro de energia relacionado aos principais radionuclídeos encontrados na amostra.

O mesmo teste foi realizado para o $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$

3.2.1.3.9. Endotoxinas

A presença de endotoxinas foi determinada em módulo PTS (*Portable Test System*). Em uma placa de testes foram adicionados 25 μL da amostra a ser analisada e a placa foi inserida no módulo PTS, o qual analisou e registrou automaticamente o resultado.

3.2.1.3.10. Esterilidade

Foram preparados previamente três tubos de tioglicolato e três tubos de meio TSB (*Trypticase Soy Broth*). Utilizando uma seringa de 1 mL, foram adicionados, a um par dos dois meios, 100 μL de solução salina estéril, como controle negativo; com a mesma seringa, alíquotas de 100 μL da amostra em análise foram adicionadas aos tubos restantes. Em seguida, os tubos de tioglicolato foram encubados entre 30 e 35 °C e os tubos de TSB entre 20 e 25 °C, pelo período de 14 dias. A esterilidade foi confirmada pela limpidez da solução.

3.2.1.3.11. Validação do processo de produção

A validação do processo de produção dos radiofármacos [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195 foi realizado através da repetição consecutiva, por 3 vezes, de todo processo produtivo e de controle de qualidade, com aprovação final do produto.

3.2.2. Indução dos modelos animais

3.2.2.3. Liselecitina em ratos

Protocolo aprovado pelo comitê de ética em uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA FMUSP nº 25/15).

Para validar o uso dos radiofármacos, [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195, em modelo pré-clínico de esclerose múltipla utilizou ratos Wistar ($n = 6$), machos, com peso entre 250 e 300 g. Estes passaram por um período de ambientação de 7 dias no biotério de experimentação do Centro de Medicina Nuclear, FMUSP, para então serem submetidos aos procedimentos experimentais. Durante todo o período experimental os animais tiveram ração e água *ad libitum*.

As coordenadas para injeção da liselecitina, solução a 1% em salina, foram determinadas com auxílio de atlas estereotático de ratos (Paxinos e Watson, 2005). Com ele, foram escolhidos três pontos de injeção no hemisfério direito cerebral (De Paula Faria et al., 2014), sendo um no corpo caloso e outros dois no estriado (figura 11). Assim, as coordenadas escolhidas para a administração da droga para indução do modelo foram: ântero-posterior, -0,30 mm, latero-lateral, -3,0 mm, e dorso-ventral corpo caloso, -3,0 mm, e estriado - 4,2 mm e - 5,0 mm.

Figura 11 - Atlas estereotático de rato ilustrando as coordenadas utilizadas para injeção da lisolecitina. Setas em vermelho indicando as regiões escolhidas para a injeção de lisolecitina, uma no corpo caloso e duas no estriado – Adaptada (Paxinos e Watson, 2005).

Os animais anestesiados (isoflurano 3% em O₂) foram posicionados no aparelho estereotático e a cabeça fixada por barras auriculares (Figura 12).

Com o animal devidamente posicionado, foi realizada uma incisão na pele na região do crânio para a localização do bregma, ponto de referência inicial do atlas estereotático. Com as coordenadas demarcadas, a calota craniana foi perfurada com broca de dentista acoplada a aparelho de baixa rotação para a entrada da agulha da seringa Hamilton® (Figura 12) até os pontos estabelecidos. Em seguida, foi inserida a agulha e iniciado o procedimento de injeção da lisolecitina, iniciando no ponto mais profundo. O volume total de injeção foi de 7 µL, sendo dividido em duas coordenadas do estriado (2 + 2 µL) e 3 µL no corpo caloso, totalizando 3 locais de injeção. O volume foi fracionado 1 µL em 10 minutos. Após a injeção de cada ponto, foram aguardados 5 minutos com a agulha no local, de modo a minimizar o refluxo do volume injetado.

Ao final das injeções foi realizada a sutura da pele e passado solução de iodo e lidocaína gel, os animais ficaram em observação até sua completa volta da anestesia e nos dias seguintes até sua completa recuperação.

Figura 12 - Rato Wistar anestesiado posicionado em aparelho estereotáxico para início de procedimento de injeção de lisolecitina nas regiões de corpo caloso e estriado.

3.2.2.4. EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

Os experimentos com saguis foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Uso de Animais da UNIFESP, Universidade Federal de São Paulo, (CEUA 2628300415) e da FMUSP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, (CEUA 056/15). Os saguis (*Callithrix jacchus*), n = 10, foram fornecidos pelo criadouro científico de primatas do laboratório de neurofisiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sem que se conhecesse a idade de cada um deles. Originalmente, os animais utilizados foram doados pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais (IBAMA) para a UNIFESP, sendo mantidos em quarentena antes do início dos experimentos. Durante o período dos experimentos, os animais foram transportados até o laboratório de medicina nuclear (LIM 43) apenas para realização das imagens, e logo retornando ao biotério de manutenção. O transporte autorizado pela Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA - SP).

Durante todo o experimento os animais foram alimentados como de costume (de manhã com variedade de 5 tipos de frutas e à tarde com legumes e proteínas) e água à vontade.

Os saguis foram divididos em dois grupos ($n = 5$), de acordo com o método de imunização utilizado. O primeiro grupo foi imunizado com uma emulsão de MOG/IFA (IFA, adjuvante incompleto de Freund; MOG, glicoproteína da mielina do oligodendrócito), e o segundo com emulsão de MOG/CFA (CFA, adjuvante completo de Freund).

A implantação do modelo no LIM 43 foi realizada em colaboração com o Centro de Pesquisa Biomédica de Primatas em Rijswijk, Holanda. O modelo de EAE foi induzida com 100 μg de proteína rhMOG (MOG recombinante humana) dissolvida em 200 μL de PBS e emulsionada com 200 μL de IFA ou CFA. As emulsões rhMOG/IFA e rhMOG/CFA foram preparadas com agitação branda a 4°C por no mínimo 1 hora (figura 13). Para imunização, os animais foram anestesiados com isoflurano 2-3%, em oxigênio 100%, tricotomia foi realizada na região posterior (costas) para facilitar a injeção intradérmica da emulsão. As injeções foram distribuídas em 4 locais, dois superiores, próximos das escápulas e dois inferiores, próximos a região lombar (Figura 14), sendo administrado 100 μL em cada local, totalizando 400 μL injetado por animal (Jagessar et. al., 2014).

Figura 13 - Preparo da emulsão para a realização de procedimento de imunização nos saguis, onde a emulsão foi mantida em agitação, por barra magnética, em banho de gelo. Círculo vermelho indica frasco com emulsão.

Figura 14 - Imagem do sagui durante processo de imunização. A) Procedimento de injeção de emulsão no dorso superior direito. B) Animal após a injeção da emulsão nos quatros sítios de injeção, dorso superior direito e esquerdo e dorso inferior direito e esquerdo indicados por seta vermelha.

Caso os animais não apresentassem sinais clínicos, eram submetidos à reimunização a cada 28 dias (mesmo procedimento descrito acima, porém com os locais de injeção próximos ao ponto anterior, mas não sobrepondo).

Os animais foram avaliados diariamente para sinais clínicos após a imunização, sendo classificados com os seguintes escores:

0 (zero) - nenhum sinal clínico

0,5 - apatia, forma de andar padrão alterado, porém sem ataxia e perda de apetite

1,0 - letargia, cauda paralisada, tremor, anorexia

2,0 - ataxia, doença ótica

2,5 - monoparesia ou paraparesia, perda sensorial

3,0 - paraplegia ou hemiplegia

4,0 - quadriplegia

5,0 - morte espontânea devido EAE

O peso dos animais foi monitorado em média 2 vezes por semana. Apresentação de escore ≥ 3 e perda de peso acentuada ($> 20\%$), com

mudança de comportamento, foram critérios para término do experimento (eutanásia).

3.2.3. Imagem molecular

3.2.3.3. Liolecitina em ratos

As imagens por PET com os radiofármacos [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195 foram realizadas em 4 tempos: basal (antes da cirurgia estereotáxica), 3 dias, 1 semana e 4 semanas após administração da liolecitina. O estudo foi realizado de maneira longitudinal, onde cada animal foi submetido a imagem com ambos os radiofármacos em cada tempo.

Os animais foram anestesiados (isoflurano 2-3% em oxigênio 100%) e posicionados com o cérebro no centro do campo de visão. As aquisições das imagens foram iniciadas logo após injeção endovenosa de 40-100 MBq do radiofármaco pela veia peniana e imagem adquirida por 60 min. As imagens com os dois radiofármacos foram realizadas no mesmo dia com um intervalo mínimo de 3 horas para decaimento radioativo.

As imagens foram reconstruídas com algoritmo OSEM 3D, 20 iterações e 4 subgrupos em dois *frames* de 30 min, sendo o último utilizado para análise. Após imagens do último tempo (4 semanas) os animais foram submetidos a uma anestesia profunda, em seguida, foi realizada perfusão intracardíaca com solução salina, seguida de solução de paraformaldeído 4% e o encéfalo coletado para análise histológica e imuno-histoquímica.

A figura 15 mostra o desenho experimental.

Figura 15 - Desenho experimental mostrando os tempos onde a aquisição das imagens com os radiofármacos [¹¹C]PIB e [¹¹C]PK11195 foram realizadas.

As imagens PET foram analisadas utilizando *software* PMOD® a partir da fusão com uma *template* de ressonância magnética (RM) disponível pelo programa e para a qual também estão disponíveis diferentes regiões de interesse (ROI) cerebrais. Em adição aos já disponíveis, foram desenhadas ROIs para a quantificação dos radiofármacos baseado no local de lesão (corpo caloso e estriado) para melhor delineamento em cada animal além de uma ROI na lateral (plano coronal) do corpo caloso. Uma ROI contralateral foi desenhada com as mesmas dimensões e mesma localização (espelhada) para cálculo da razão de captação.

No anexo I é mostrada a imagem fusionada de ressonância magnética e PET com as ROIs desenhadas na região lateral do corpo caloso e no anexo II é mostrada as ROIs desenhadas nas regiões do corpo caloso, próximo a lesão, e do estriado, ambas nos três planos anatômicos.

3.2.3.4. EAE em saguis

As imagens por PET com os radiofármacos [¹¹C]PIB e [¹¹C]PK11195 foram realizadas longitudinalmente em dois tempos, dependendo da progressão da doença em cada animal: basal (antes da imunização) e após aparecimento de sinais clínicos. Com os animais imunizados com MOG/IFA também foi realizada uma imagem intermediária, 60 dias após a imunização, com o radiofármaco [¹¹C]PK11195. O intervalo entre as imagens de [¹¹C]PIB e [¹¹C]PK11195 de cada ponto foi menor que uma semana. As imagens foram adquiridas após injeção endovenosa de 37-111 MBq do radiofármaco pela veia

femoral (peniana foi uma opção para os animais machos) e imagem adquirida por 60 min.

As imagens foram reconstruídas com algoritmo OSEM 3D, 20 iterações e 4 subgrupos em dois frames de 30 minutos, sendo o último utilizado para análise quantitativa.

Os animais foram eutanasiados com 1 mL de pentobarbital (0,3 mg/mL) intraperitoneal após última imagem PET. Após o processo de eutanásia os cérebros foram retirados, colocados em paraformaldeído 4% por uma semana e depois armazenados em sacarose 30% até serem cortados para análise histológica e imuno-histoquímica.

Na figura 16 é apresentado o desenho experimental, destacando aquisição de imagem PET, dia da imunização, dia das reimunizações, aquisição de imagem de RM e fim dos experimentos *in vivo*.

Figura 16 - Desenho experimental indicando os dias em que ocorreram os processos de aquisição de imagem PET com os radiofármacos $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ e $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$, processos de imunização e reimunização, eutanásia dos animais e imagem de RM.

A quantificação das imagens por PET dos saguis também foram realizadas pelo software PMOD®.

Utilizando na imagem de RM, duas regiões de interesse (ROIs) foram desenhadas em uma primeira análise, sendo a primeira abrangendo todo o encéfalo do animal (Anexo III) e a segunda uma região com captação inespecífica dos radiofármacos e que estivesse no campo de visão da imagem PET, sendo o músculo ao redor da calota craniana dos animais a referência utilizada (Anexo IV). Após o desenho das ROIs, foi realizada a fusão das imagens PET com a RM e as mesmas foram quantificadas.

Após a análise global do encéfalo dos animais, foi realizada uma análise nas principais regiões cerebrais. As ROIs foram desenhadas manualmente a partir do atlas estereotático voltado para saguis. Para esta, foi utilizada uma *template* de RM (sequência ponderada em T2) para saguis (DEVELOPMENT, 2018), e nesta foram desenhadas as ROIs. Da mesma maneira que a análise anterior, a captação do músculo ao redor da calota craniana foi utilizada como região de captação inespecífica dos radiofármacos. O anexo V mostra as regiões que foram desenhadas na RM e utilizadas para quantificação das imagens PET.

3.2.4. Imuno-histoquímica

Após a perfusão intracardíaca, os encéfalos dos ratos e saguis foram coletados e armazenados por um período de 7 dias em paraformaldeído 4% e depois crioprotetidos em sacarose 30% por pelo menos 48 horas. Cortes coronais de 30 µm de espessura foram realizados em micrótomo deslizante de congelamento e colocados em solução de tampão fosfato 0,1 M, ou em solução anti-congelamento (500 mL de solução fosfato 1 M, 150 g de sacarose e 300 mL de etileno glicol) para armazenamento do material em freezer.

Os cortes selecionados foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para análise da molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba-1), um marcador de micróglia ativada, e da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), marcador de astrócitos.

Para realização do procedimento, os cortes foram primeiramente banhados em solução de peróxido de hidrogênio 0,3% durante 10 minutos, para remoção da peroxidase endógena, e em seguida foram realizadas três lavagens com solução de tampão fosfato 0,1M por dez minutos cada. Após as lavagens, os cortes foram incubados por 12-16 h em temperatura ambiente com os anticorpos primários Iba-1 feito em cabra ou GFAP feito em camundongo (1:1000), diluído em tampão fosfato 0,1M, contendo 0,3% de triton X-100 e 5% de soro normal de jumento. Após o período de incubação, os cortes foram lavados e incubados por 2 horas em temperatura ambiente com o

anticorpo secundário biotinilado, específico para o animal ao qual foi feito o anticorpo primário, sendo eles: anticorpo secundário contra camundongo feito em jumento biotinilado, e anticorpo secundário contra cabra feito em jumento biotinilado (1:200), diluído em tampão fosfato 0,1M, contendo 0,3% de triton X-100. Após nova série de lavagens, os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC - 1:100) diluído em tampão fosfato 0,1M, contendo 0,3% de triton X-100 e 0,4M de NaCl, durante 2 h. A coloração do tecido foi realizado pela técnica de peroxidase usando 3,3'-diaminobenzidina 0,05% (DAB) e peróxido de hidrogênio 0,01% em PB 0,1 M. Após o procedimento de coloração, os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas e deixadas em uma placa aquecida para secagem. Após secarem, os cortes foram hidratados em água destilada por 1 minuto, banhadas em solução de tetróxido de ósmio 0,1% por 15 – 30 segundos para intensificação da coloração, desidratadas por uma série de alcoóis em concentrações crescentes, clareadas com xilol e cobertas com lamínulas, tendo como meio de montagem o Permount®. A imunorreatividade das regiões de interesse foi analisada ao microscópio óptico. Imagens obtidas dos cortes histológicos em microscópio próprio foram analisadas com auxílio do software imageJ (NIH, USA), através da ferramenta de densidade óptica.

3.2.5. Análise histológica

Foi realizada a técnica histológica de *luxol fast blue* com amostra tecidual dos dois modelos animais para avaliar as mudanças nos níveis de mielina. Para isso, os cortes passaram por duas etapas, sendo elas: preparação do material e a coloração.

Na primeira etapa, os cortes que não foram utilizados na imunohistoquímica foram colocados em lâminas gelatinizadas e mantidos *overnight* em placa quente (37 °C). Em seguida, foram mantidos por 5 minutos em solução de PFA 4%, lavados por 3 vezes de 5 minutos em solução salina tamponada com fosfato (PBS), e desidratados em uma série crescente de

alcoóis (50%, 70%, 80% e 96%, 5 minutos em cada). A figura 17 esquematiza os procedimentos realizados nesta primeira etapa.

Figura 17 - Esquematização dos procedimentos realizados no preparo das lâminas para a coloração histoquímica com *luxol fast blue*.

Na etapa de coloração, as lâminas foram incubadas por 12 horas em solução de *luxol fast blue* (0,5 g de Solvente Blue 38 em 500 mL de solução de ácido acético 10% em álcool 96%) em estufa a 60 °C. Após o período de incubação, as lâminas foram retiradas da estufa e mantidas em temperatura ambiente por uma hora, em seguida, submetidos a uma sequência de lavagem, sendo ela: álcool 96%, água corrente (2 min), água destilada, carbonato de lítio a 0,125%, álcool 70%, água destilada, carbonato de lítio a 0,125% e água destilada. Na figura 18 é apresentado esquematicamente as etapas realizadas na coloração.

Figura 18 - Esquema das etapas realizadas no processo histológico de coloração com *luxol fast blue*.

Em seguida, as lâminas foram submersas por 2 minutos em uma solução de cresil violeta [(2,5 g de acetato de cresil de violeta em 500 mL de água destilada, pH 3-3,5 (ajustado o pH com ácido acético))] para marcação dos corpúsculos de Nissl. Em seguida, submetidos a uma sequência crescente de álcoois por 5 minutos em cada solução (70%, 90% e 2 vezes em álcool absoluto). As lâminas foram então submersas em solução clareadora de xilol por 2 vezes de 5 minutos e então cobertas com lamínulas de vidro e solução PermOUNT®. Após esta etapa foi realizada a captura de imagens em microscópio óptico acoplado a câmera para análise com auxílio do software ImageJ (NIH, USA).

As imagens de *luxol fast blue* foram quantificadas realizando uma razão entre a diferença da coloração da área lesionada pela área não lesionada da região de interesse.

3.2.6. Autorradiografia *in vitro*

Cortes das regiões de interesse do encéfalo de ratos e saguis foram colocados em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram incubadas em 100 ml de solução de PBS com aproximadamente 1 mCi do radiofármaco ($[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ ou $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$) por 10 minutos, em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 20 minutos (De Paula Faria et. al., 2014).

Após a secagem das lâminas com nitrogênio, por cerca de 10 minutos, as mesmas foram colocadas em contato com placa de fósforo e deixadas em ambiente com ausência de luz por duas horas e em seguida, a placa de fósforo foi colocada em equipamento de autorradiografia (GE Typhoon FLA 9500) para a leitura da placa a um tamanho de pixel de 25 μm .

3.2.7. Análise estatística

Para a realização da análise estatística deste trabalho foi utilizado o *software* GraphPad Prism[®] versão 6.01, nele foi realizado o teste de ANOVA de uma via para análise dos dados obtidos na quantificação das imagens PET dos roedores, teste T de *student* pareado para os dados das imagens PET dos primatas não humanos e teste de correlação para os ensaios de imunohistoquímica e histologia. Os dados obtidos estão apresentados através do valor da média com o desvio padrão e foram considerados como valores significativos os achados com valores de $p \leq 0,05$, utilizando as notações $< 0,05$ (*), $< 0,01$ (**) e $< 0,001$ (***).

4. Resultados

4.2. Síntese e controle de qualidade dos radiofármacos

Foi realizado um total de dezenove produções de [^{11}C]PIB para as imagens de ambos os modelos animais, obtendo uma média de atividade final de 20 ± 11 mCi.

Para o [^{11}C]PK11195 foram necessárias vinte e duas produções, onde a média da atividade final foi de 15 ± 9 mCi.

4.3. Controle de Qualidade

A curva de calibração do [^{11}C]PIB apresentou um valor de R igual a 0,9916 e a do [^{11}C]PK11195 um R igual a 0,9956 (Figura 19).

Figura 19 – Gráficos obtidos para a curva de calibração dos radiofármacos [^{11}C]PIB (A) e [^{11}C]PK11195 (B).

4.3.1. Controle visual

Não foi encontrada nenhuma partícula dentro do frasco contendo o produto final.

4.3.2. Determinação do potencial de hidrogênio (pH)

O valor obtido para pH estava dentro do padrão estabelecido em todas as produções.

4.3.3. Pureza química

Ambos os radiofármacos apresentaram um valor de pureza química superior a 95 % para todas as produções, assim, ficaram dentro do esperado.

4.3.4. Pureza radioquímica

A taxa média apresentada de pureza radioquímica pelo [^{11}C]PIB foi de $98 \pm 1,24$ % e para o [^{11}C]PK11195 foi de $99,5 \pm 0,5$ %.

4.3.5. Determinação da atividade específica

A média obtida para a atividade específica do [^{11}C]PIB foi de 133 ± 48 GBq/ μmol e do [^{11}C]PK11195 295 ± 203 GBq/ μmol .

4.3.6. Solventes residuais

Para o [^{11}C]PIB, os valores médios obtidos para solventes residuais foram de $0,005 \pm 0,002$ mg/L para acetonitrila, butanona de $0,000$ mg/L e etanol de $7,06 \pm 0,94$ g/L.

O [^{11}C]PK11195 apresentou $8,05 \pm 0,74$ g/L de etanol e para DMSO $0,000$ mg/L.

4.3.7. Identidade radionuclídica

O valor médio obtido para a identidade radionuclídica foi de 20,52 min $\pm$ 0,11 min

4.3.8. Pureza radionuclídica

O valor da pureza radionuclídica obtido estava dentro do espectro de gamma exigido, 490 a 530 keV.

4.3.9. Endotoxinas

Para endotoxinas, o resultado obtido para ambos os radiofármacos ficou abaixo de 5 EU/mL

4.3.10. Esterilidade

Todas as amostras se apresentaram estéril.

A tabela 3 apresenta os valores médios obtidos para as produções [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195.

Tabela 3 – Valores médios obtidos para as produções de [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195.

Teste	Referência	[^{11}C]PIB	[^{11}C]PK11195
Controle visual	Límpido/Incolor	Límpido/Incolor	Límpido/Incolor
Pureza química	<1 mg/mL	<1 mg/mL	<1 mg/mL
Pureza radioquímica	>95 %	98%	99,50%
Atividade específica	>20 GBq/ μmol	133 GBq/ μmol	295 GBq/ μmol
Solventes residuais			
Acetonitrila	<10 mg/L	0,004 mg/L	NA
2-Butanona	<100 mg/L	0,000 mg/L	NA
Etanol	< 100 g/L	6,887 g/L	8,05 g/L
DMSO	<10 mg/L	NA	0,000
Identidade radionuclídica	$T_{1/2} = 20,4$ $\pm 10\%$ min	20,52 min	20,52
Pureza radionuclídica	511 a 1022 keV	525 keV	521,4 keV
Endotoxinas	<17,5 EU/mL	<5 EU/mL	<5 EU/mL
Esterilidade	Estéril	Estéril	Estéril

4.4. Modelo Animal

4.4.1. Liolecitina em Ratos

Após o procedimento cirúrgico, os ratos permaneceram estáveis e a partir do segundo dia começaram a agir normalmente sem apresentação de nenhum sinal clínico relevante.

4.4.2. Modelo EAE em sagui

A incidência de sinais clínicos nos saguis foi de 100 % nos animais imunizados com MOG/IFA e também de 100% nos animais imunizados com MOG/CFA.

No grupo IFA, foi considerado um grupo de 4 animais pois um dos animais morreu poucos dias após a primeira imagem de PET não podendo, portanto, ser relacionado com o modelo, conforme figura 20.

Do grupo MOG/CFA, o animal M9 também foi excluído, pois morreu durante a aquisição da imagem final, assim, este animal foi desconsiderado para a análise das imagens.

Figura 20 - Progressão da doença através de avaliação dos sinais clínicos (escore). A) Animais imunizados com MOG/IFA; B) Animais imunizados com MOG/CFA.

No grupo MOG/IFA, processos animais M1, M2 e M5 tiveram que ser reimunizados por três vezes e o animal M3 foi reimunizado duas vezes. No grupo MOG/CFA, os animais M6, M7 e M9 foram reimunizados uma vez, enquanto os animais M8 e M10 tiveram que ser reimunizados duas vezes. Na tabela 4 são apresentados os códigos dos animais, sexo, modelo de imunização e o número de reimunizações. A figura 21 apresenta a comparação do número de reimunizações entre os grupos MOG/IFA e MOG/CFA.

Tabela 4 - Identificação dos animais e respectivo método de imunização e quantidade de reimunizações realizada em cada animal.

Sagui	Sexo	Tipo de Imunização	Número de Reimunizações
M1	F	IFA	3
M2	F	IFA	3
M3	F	IFA	2
M4	F	IFA	0
M5	F	IFA	3
M6	M	CFA	1
M7	M	CFA	1
M8	F	CFA	2
M9	M	CFA	1
M10	F	CFA	2

Figura 21 – Comparação do número de reimunizações necessárias ao longo do período experimental entre os grupos MOG/IFA e MOG/CFA. * = $P < 0,05$

A variação de peso ocorreu em ambos os grupos. Para o grupo MOG/IFA a perda de peso, em relação ao início do experimento, para os animais M1, M2, M3, M4 e M5 foi de 13%, 7%, 3%, 10% e 13%, respectivamente. No grupo MOG/CFA as perdas registradas foram de 13%,

16%, 20%, 25% e 13% para os animais M6, M7, M8, M9 e M10, respectivamente. A figura 22 mostra as variações de peso dos animais de ambos os grupos e na figura 23 são mostradas as variações entre os grupos.

Figura 22 - Evolução do peso de cada animal durante o experimento. A) Animais imunizados com IFA/MOG; B) Animais imunizados com CFA/MOG.

Figura 23 – Variação, em porcentagem, do peso final dos animais dos grupos MOG/IFA e MOG/CFA comparado com o peso inicial dos mesmos.

4.5. Imagem molecular

4.5.1. Liolecitina em ratos

As imagens com o radiofármaco [^{11}C]PK11195 mostraram um aumento do processo inflamatório nas regiões de injeção de liolecitina na primeira semana de experimento. Após 4 semanas a captação já havia diminuído, porém ainda não havia retornado ao estágio inicial (Figura 24). Com o [^{11}C]PIB não foi observado uma perda de mielina na região injetada durante todo o período experimental (Figura 25).

Figura 24 - Imagens ilustrativas de PET [^{11}C]PK11195 fusionadas com *template* de RM. A) Imagens da ressonância magnética utilizada como *template* para quantificação da imagem de PET. B) Imagens da fusão da aquisição de PET com a *template* de ressonância magnética RM antes da administração de lisolecitina (basal), 3 dias, 1 e 4 semanas após a injeção. Setas brancas indicam processo inflamatório.

Figura 25 - Imagens ilustrativas de PET $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ fusionadas com *template* de ressonância magnética (RM). A) Imagens de RM utilizada como *template* para a quantificação da imagem de PET. B) Imagens de $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ fusionadas com imagem de RM nos diferentes tempos (basal, 3 dias, 1 semana e 4 semanas).

Os valores obtidos para a região do estriado na relação de captação entre a lesão e o lado contralateral do cérebro para o [^{11}C]PK11145 foi de $1,00 \pm 0,12$ para imagem basal, $1,08 \pm 0,15$ para 3 dias, $1,24 \pm 0,19$ para uma semana, apresentando um aumento significativo quando comparado com o basal ($P < 0,05$), e para 4 semanas de $1,04 \pm 0,13$. Para o [^{11}C] PIB os valores obtidos para esta mesma região foram de $0,93 \pm 0,13$, $0,95 \pm 0,13$, $1,06 \pm 0,25$ e $1,02 \pm 0,18$ para basal, três dias, uma semana e quatro semanas respectivamente, não apresentando diferença estatística em nenhum dos pontos.

Para a região do corpo caloso, a relação entre os valores de captação do [^{11}C]PK11195 entre a lesão e o lado contralateral do cérebro foi de $0,98 \pm 0,11$ para imagem basal, $1,01 \pm 0,12$ para 3 dias, $1,23 \pm 0,14$ para 1 semana, aumento significativo de 24 % ($P = 0,002$), e $0,97 \pm 0,06$ para 4 semanas. O [^{11}C]PIB não apresentou diferença significativa para os tempos comparados com o basal, a quantificação obtida para os tempos basal, 3 dias, 1 semana e 4 semanas respectivamente os valores de $1,02 \pm 0,08$, $1,10 \pm 0,14$, $1,00 \pm 0,05$ e $1,09 \pm 0,13$.

A figura 26 apresenta os valores de quantificação de [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB para as regiões do corpo caloso e do estriado.

Figura 26 - Quantificação da captação dos radiofármacos [¹¹C]PK11195 e [¹¹C]PIB para a relação entre a lesão e o lado contralateral nas regiões do corpo caloso e estriado. * P < 0.05, ** P < 0.01.

4.5.2. EAE em sagui

As imagens dos saguis realizadas nos dois tempos, basal e final, com os radiofármacos [¹¹C]PIB apresentou diferença visual e estatística em alguns animais de ambos os grupos estudados assim como as imagens de [¹¹C]PK11195. A figura 27 ilustra as imagens de RM e de PET fusionadas adquiridas com o [¹¹C]PIB e a figura 28 ilustra a fusão da imagem de RM com a de [¹¹C]PK11195.

Figura 27 - Imagens PET com o radiofármaco $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ de diferentes regiões do encéfalo de sagui. A) Ressonância magnética utilizada como *template* para a quantificação das imagens de PET. B) Fusão da imagem de $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ com ressonância magnética nos tempos basal e final dos animais dos grupos MOG/IFA e MOG/CFA. Setas brancas indicam pontos hipocaptantes.

Figura 28 - Imagens PET com $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ em diferentes regiões do encéfalo de sagui. A) Imagem da RM utilizada como *template* para a quantificação da imagem de PET. B) Fusão da imagem de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ com imagem de RM nos tempos basal, intermediário e final do grupo MOG/IFA e dos tempos basal e final do grupo MOG/CFA. Setas indicam pontos hipercaptantes.

As quantificações de cérebro total nos tempos basal e final, não apresentaram diferenças significantes para ambos os radiofármacos, $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ e $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$, conforme mostrado na figura 29.

Figura 29 - Relação entre a captação do cérebro total e região de captação inespecífica (músculo externo da cabeça) com os radiofármacos $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ e $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ em modelo de EAE em primatas não humanos imunizados com MOG/IFA e MOG/CFA.

Os resultados para a quantificação das principais regiões anatômicas para os radiofármacos $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ e $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ para os grupos MOG/IFA e MOG/CFA foram:

MOG/IFA

A tabela 5 mostra a diferença de captação do radiofármaco $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$, em porcentagem, entre o tempo final e basal para cada animal do grupo MOG/IFA.

Tabela 5 – Diferença entre a captação do radiofármaco [^{11}C]PIB, em porcentagem, entre o tempo final e basal para o grupo MOG/IFA nas regiões analisadas. Números em negrito indicam alterações acima de 25 %.

MOG/IFA - Final x Basal								
Volumes de interesse	M1		M2		M3		M5	
Cérebro total	↓ 21,6		↓ 20		↓ 18		0	
Borda lateral do córtex cingulado	↓ 3,4		↓ 45,2		↓ 31,9		↑ 13,9	
Borda inferior do córtex cingulado	↓ 27,8		↓ 27,2		↓ 14,8		↓ 5,3	
Medula espinhal	↓ 21,3		↓ 28,3		↓ 21,9		↑ 11,3	
Cerebelo	↓ 15,8		↓ 20,3		↓ 24,7		↑ 17,6	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
Comissura anterior	↑ 4,3	↓ 21,8	↓ 14,2	↑ 8,3	↑ 7,7	↓ 21,7	0	↓ 11,1
Corpo caloso	↓ 25,1	↓ 23,5	↓ 79,0	↓ 3,3	↓ 16,4	↓ 8,8	↓ 15,3	↓ 18,2
Córtex cingulado	↓ 11,3	↓ 7,7	↓ 60,1	↓ 35,6	↓ 24,0	↓ 25,7	↑ 5,4	↑ 8,0
Globo pálido	↓ 31,0	↓ 17,4	↓ 35,8	↑ 25,4	↓ 19,2	↓ 3,6	↓ 6,8	↓ 7,3
Cabeça do núcleo caudado	↓ 19,4	↓ 33,5	↓ 59,7	↑ 1,4	↓ 4,5	↓ 26,7	↓ 17,9	↓ 30,7
Hipocampo	↓ 33,5	↓ 24,2	↓ 4,0	↑ 23,0	↓ 24,6	↓ 11,8	↓ 11,4	↓ 5,8
Cápsula interna	↓ 12,0	↓ 21,0	↓ 52,7	↑ 9,9	↑ 9,8	↓ 18,4	↓ 13,0	↓ 16,1
Mesencéfalo	↓ 24,6	↓ 24,5	↓ 13,4	↑ 8,7	↓ 25,5	↓ 20,1	↑ 16,6	↑ 15,4
Córtex motor	↓ 2,5	↓ 10,8	↓ 82,9	↓ 10,4	↓ 12,3	↑ 1,8	↑ 3,8	↑ 0,8
Trato óptico	↓ 25,9	↓ 30,3	↓ 8,2	↑ 10,4	↑ 16,0	↓ 31,1	↓ 1,8	↑ 8,3
Córtex motor	↓ 15,2	↓ 6,2	↓ 87,7	↓ 16,8	↓ 10,2	↑ 5,2	↓ 6,3	↑ 1,7
Putamen	↓ 19,2	↓ 16,8	↓ 71,3	↓ 14,0	↓ 9,2	↑ 12,4	↓ 9,9	↓ 9,1
Córtex somatosensorial	↓ 3,6	↓ 11,5	↓ 86,6	↑ 23,0	↑ 20,4	↓ 25,9	↓ 4,3	↓ 20,7
Esplênio do corpo caloso	↓ 32,2	↓ 23,9	↓ 73,7	↑ 34,6	↑ 28,3	↓ 10,1	↓ 21,2	↓ 19,9
Córtex subpial	↓ 13,0	↓ 6,2	↓ 67,5	↑ 26,8	↑ 13,6	↓ 12,2	↑ 5,8	↓ 1,8
Cauda do núcleo caudado	↓ 35,0	↓ 34,2	↓ 48,2	↑ 20,9	↑ 19,5	v 28,6	↓ 15,1	↓ 10,6
Tálamo	↓ 19,6	↓ 27,8	↓ 28,7	↑ 17,2	↑ 11,2	↓ 12,3	↑ 2,0	↑ 7,5
Córtex visual	↓ 28,1	↓ 31,6	↓ 68,5	↑ 23,4	↑ 28,8	↓ 19,9	↑ 12,4	↑ 14,0

↓ = redução; ↑ = aumento

A tabela 6 mostra a diferença de captação do radiofármaco [^{11}C]PK11195, em porcentagem, entre os tempos basal e intermediário para o grupo MOG/IFA.

Tabela 6 – Diferença da captação do radiofármaco [^{11}C]PK11195, em porcentagem, entre os tempos intermediário e basal do grupo MOG/IFA. Números em negrito indicam alterações acima de 25 %.

MOG/IFA - Intermediária x Basal								
Volumes de interesse	M1		M2		M3		M5	
Cérebro total	↓ 10,9		↑ 17,4		↑ 32,9		↓ 2,3	
Borda lateral do córtex cingulado	↓ 10,1		↑ 13,1		↑ 37,5		↓ 19,6	
Borda inferior do córtex cingulado	↓ 42,1		↑ 20,6		↑ 31,3		↓ 25,2	
Medula espinhal	↓ 21,0		↑ 18,4		↑ 35,7		↓ 7,2	
Cerebelo	↓ 27,7		↑ 19,6		↑ 39,6		↓ 15,9	
	Direito		Esquerdo		Direito		Esquerdo	
Comissura anterior	↓ 16,7	↓ 16,5	↓ 3,8	↑ 31,8	↑ 38,3	↑ 45,4	↑ 13,1	↓ 3,7
Corpo caloso	↓ 7,6	↓ 28,4	↑ 20,1	↑ 19,7	↑ 24,3	↑ 30,9	↓ 1,6	↓ 21,5
Córtex cingulado	↓ 9,0	↓ 21,3	↑ 23,3	↑ 14,7	↑ 33,7	↑ 37,7	↓ 22,3	↓ 28,9
Globo pálido	↑ 1,3	↑ 5,7	↑ 29,4	↑ 2,2	↑ 38,8	↑ 38,0	↑ 3,2	↑ 1,6
Cabeça do núcleo caudado	↑ 3,4	↓ 13,2	↑ 19,7	↑ 24,0	↑ 33,7	↑ 32,9	↑ 16,5	↓ 4,6
Hipocampo	↑ 10,0	↓ 2,5	↑ 15,6	↑ 17,4	↑ 29,4	↑ 29,4	↑ 13,3	↓ 10,2
Cápsula interna	↑ 7,0	↓ 3,5	↑ 9,3	↑ 28,9	↑ 41,9	↑ 38,4	↓ 0,5	↓ 4,4
Mesencéfalo	↓ 17,1	↓ 16,9	↑ 15,9	↑ 22,0	↑ 37,1	↑ 33,5	↓ 10,7	↓ 7,1
Córtex motor	↑ 10,2	↓ 20,6	↑ 29,9	↑ 15,6	↑ 36,0	↑ 28,5	↑ 4,0	↓ 34,3
Trato óptico	↓ 19,2	↓ 8,1	↑ 5,0	↓ 6,8	↑ 19,5	↑ 22,0	↑ 2,8	↑ 19,1
Córtex motor primário	↑ 9,4	↓ 23,4	↑ 26,4	↑ 15,3	↑ 25,2	↑ 33,8	↑ 15,4	↓ 10,4
Putamen	↑ 4,0	↑ 8,3	↑ 17,9	↑ 33,2	↑ 40,7	↑ 40,0	↑ 3,7	↓ 12,7
Córtex somatosensorial	↑ 17,4	↓ 6,2	↑ 26,2	↑ 12,1	↑ 24,7	↑ 26,3	↑ 19,7	↓ 4,7
Esplênio do corpo caloso	↑ 13,0	↓ 15,0	↑ 14,6	↑ 8,9	↑ 29,0	↑ 30,6	↑ 8,5	↑ 9,1
Córtex subpial	↑ 21,4	↓ 11,4	↑ 23,0	↑ 4,3	↑ 25,8	↑ 25,9	↑ 22,1	↑ 1,4
Cauda do núcleo caudado	↑ 8,6	↑ 7,1	↑ 7,4	↑ 26,5	↑ 38,1	↑ 18,6	↑ 20,7	↑ 25,4
Tálamo	↑ 1,9	↓ 1,2	↑ 10,4	↑ 23,6	↑ 44,4	↑ 35,2	↓ 20,1	↑ 1,3
Córtex visual	↓ 33,9	↓ 19,9	↑ 4,7	↑ 3,5	↑ 35,0	↑ 38,6	↓ 19,6	↓ 22,9

↑ = aumento; ↓ = redução

A tabela 7 mostra a diferença de captação, em porcentagem, entre o tempo final e basal do radiofármaco [^{11}C]PK11195 para o grupo MOG/IFA.

Tabela 7 – Diferença de captação do radiofármaco [^{11}C]PK11195, em porcentagem, para o grupo MOG/IFA entre as imagens final e basal. Números em negrito indicam alterações acima de 25 %.

MOG/IFA - Final x Basal								
Volumes de interesse	M1		M2		M3		M5	
Cérebro total	↑	52,2	↓	47,2	↑	36,9	↓	8,0
Borda lateral do córtex cingulado	↑	49,0	↓	67,9	↑	37,2	↓	21,3
Borda inferior do córtex cingulado	↑	57,6	↓	38,21	↑	24,4	↑	25,8
Medula espinhal	↑	46,9	↓	30,3	↑	38,0	↓	13,0
Cerebelo	↑	49,5	↓	39,1	↑	44,7	↓	18,9
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
Comissura anterior	↑	48,4	↑	53,7	↓	70,8	↓	71,1
Corpo caloso	↑	33,4	↑	41,6	↓	7,3	↓	12,3
Córtex cingulado	↑	55,5	↑	48,9	↓	49,1	↓	48,9
Globo pálido	↑	51,1	↑	50,8	↓	63,0	↓	56,2
Cabeça do núcleo caudado	↑	54,5	↑	57,8	↓	38,2	↓	84,9
Hipocampo	↑	33,8	↑	34,7	↑	0,1	↓	9,8
Cápsula interna	↑	54,1	↑	56,0	↓	43,4	↓	56,4
Mesencéfalo	↑	54,1	↑	56,0	↓	43,4	↓	56,4
Córtex motor	↑	56,2	↑	53,3	↓	64,8	↓	42,8
Trato óptico	↑	56,2	↑	53,3	↓	64,8	↓	42,8
Córtex motor primário	↑	53,2	↑	54,8	↓	52,8	↓	64,5
Putamen	↑	53,2	↑	54,9	↓	52,4	↓	34,0
Córtex somatosensorial	↑	53,2	↑	54,9	↓	52,4	↓	34,0
Esplênio do corpo caloso	↑	58,5	↑	44,3	↓	24,4	↓	63,5
Córtex subpial	↑	51,5	↑	49,7	↓	46,6	↓	71,7
Cauda do núcleo caudado	↑	59,0	↑	47,7	↓	39,7	↓	51,3
Tálamo	↑	55,6	↑	54,3	↓	55,6	↓	43,6
Córtex visual	↑	42,9	↑	37,6	↑	8,1	↓	11,2
	↑	59,5	↑	47,8	↓	22,7	↓	56,7
	↑	37,7	↑	37,5	↑	14,4	↓	10,3
	↑	56,2	↑	50,2	↓	37,9	↓	68,6
	↑	34,4	↑	32,4	↑	21,2	↓	5,6
	↑	52,8	↑	42,7	↓	20,7	↓	48,9
	↑	34,8	↑	34,0	↑	11,3	↓	8,4
	↑	57,6	↑	49,5	↓	38,2	↓	48,8
	↑	24,4	↑	27,0	↑	25,8	↓	20,2
	↑	54,2	↑	57,5	↓	52,9	↓	59,5
	↑	39,1	↑	34,6	↓	23,3	↓	27,4
	↑	48,6	↑	50,2	↓	82,7	↓	72,7
	↑	36,5	↑	41,7	↓	25,2	↓	22,5

↑ = aumento; ↓ = redução

Foi observado uma diminuição significativa na captação de [^{11}C]PIB na região do esplênio do corpo caloso direito de 38,17 % ($P = 0,0365$) conforme demonstrado na figura 30.

Figura 30 - Relação de captação entre as regiões do esplênio do corpo caloso direito com o músculo da cabeça para o grupo MOG/IFA com o radiofármaco [¹¹C]PIB. * P < 0.05.

Para a região do globo pálido direito do grupo IFA/MOG foi observada uma redução significativa na captação de [¹¹C]PIB de 22,75 % (P = 0,0355). A figura 31 mostra a razão da captação desta região com a região de captação inespecífica.

Figura 31 - Razão de captação entre o globo pálido direito e captação inespecífica, músculo da cabeça no grupo MOG/IFA para [¹¹C]PIB. * P < 0,05.

Para a região do núcleo caudado direito o grupo IFA/MOG apresentou uma redução significativa na captação de [^{11}C]PIB de 29,36 % ($P = 0,0284$), conforme demonstrado na figura 32.

Figura 32 - Quantificação dos radiofármacos [^{11}C]PIB na região do núcleo caudado inferior direito em modelos de EAE em saguis imunizados com MOG/IFA. * $P < 0.05$.

Na região do córtex cingulado anterior foi observado uma redução significativa na captação do [^{11}C]PIB de 18,99 % para o grupo MOG/IFA ($P = 0,0453$). A figura 33 mostra os valores obtidos para esta região.

Figura 33 - Razão de captação entre o córtex cingulado anterior e captação inespecífica do músculo da cabeça no grupo MOG/IFA para o radiofármaco [^{11}C]PIB. * $P < 0.05$.

Foi observada uma redução significativa na captação de [^{11}C]PK11195 na imagem intermediária comparada com a captação basal no grupo MOG/IFA nas regiões do córtex somatossensorial direito, 22,8 % ($P = 0,0041$), córtex de associação direito, 18,98 % ($P = 0,0228$), córtex subpial direito, 23,37 % ($P = 0,0006$), e região do núcleo caudado inferior esquerdo, 18,97 % ($P = 0,0233$). A figura 34 mostra os valores obtidos para essas regiões.

Figura 34 – Regiões com redução na captação do radiofármaco [^{11}C]PK11195 no ponto intermediário dos animais do grupo MOG/IFA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

MOG/CFA

A diferença, em porcentagem, de captação entre os tempos basal e final para o grupo MOG/CFA com o radiofármaco [^{11}C]PIB são apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Diferença, em porcentagem, da captação do radiofármaco [^{11}C]PIB entre os tempos final e basal para o grupo MOG/CFA. Números em negrito indicam alterações acima de 25 %.

MOG/CFA - Final x Basal								
Volumes de interesse	M6		M7		M8		M10	
Cérebro total	↓ 9,8		↓ 1,0		↑ 3,3		↓ 17,0	
Borda lateral do córtex cingulado	↓ 8,9		↓ 11,7		↑ 0,61		↓ 19,1	
Borda inferior do córtex cingulado	↓ 15,0		↓ 11,5		↑ 5,3		↓ 6,5	
Medula espinhal	↓ 7,7		↓ 8,9		↓ 1,1		↓ 14,4	
Cerebelo	↓ 3,2		↓ 11,8		↓ 3,2		↓ 17,5	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
Comissura anterior	↓ 14,7	↓ 12,2	↓ 1,7	↓ 8,0	↓ 2,9	↑ 12,7	↓ 5,5	↑ 0,8
Corpo caloso	↓ 21,1	↓ 16,5	↓ 8,7	↓ 17,7	↑ 7,0	↑ 6,3	↓ 17,8	↑ 16,9
Córtex cingulado	↓ 16,1	↓ 1,4	↓ 2,3	↓ 1,4	↓ 3,2	0	↓ 24,2	↓ 5,9
Globo pálido	↓ 18,6	↓ 9,5	↓ 2,7	↓ 16,5	↑ 12,1	↑ 12,9	↓ 23,4	↓ 14,0
Cabeça do núcleo caudado	↓ 27,8	↓ 16,8	↓ 8,7	↓ 11,4	↑ 15,0	↑ 2,2	↓ 15,2	↓ 3,9
Hipocampo	↓ 3,1	↓ 11,4	↓ 8,2	↓ 8,2	↑ 11,4	↑ 4,1	↓ 26,2	↓ 33,9
Cápsula interna	↓ 28,5	↓ 14,7	↓ 2,2	↓ 13,5	↑ 1,7	↑ 11,1	↓ 13,2	↓ 3,7
Mesencéfalo	↑ 0,9	↓ 2,5	↓ 1,5	↓ 7,5	↓ 4,8	↑ 8,4	↓ 15,3	↓ 2,7
Córtex motor	↓ 9,7	↓ 11,9	↓ 3,8	↓ 6,2	↑ 1,6	↓ 9,0	↓ 1,5	↓ 9,7
Trato óptico	9,7	↓ 7,1	↓ 13,9	↓ 14,1	↑ 0,8	↑ 4,9	↓ 11,5	↓ 11,0
Córtex motor primário	↓ 8,2	↓ 15,2	0	↓ 2,7	↑ 5,8	↓ 1,7	↓ 12,4	↓ 2,7
Putamen	↓ 13,0	↓ 12,1	↓ 19,3	↓ 14,0	↑ 5,6	↑ 12,4	↓ 1,1	↓ 9,1
Córtex somatosensorial	↓ 1,5	↓ 11,5	↑ 2,6	↓ 3,0	↓ 1,4	↓ 2,4	↓ 11,9	↓ 11,6
Esplênio do corpo caloso	↓ 23,3	↓ 19,7	↓ 15,1	↓ 17,2	↑ 4,6	↑ 1,6	↓ 17,9	↓ 18,4
Córtex subpial	↓ 2,3	↓ 9,2	↓ 6,5	↓ 8,4	↑ 1,2	↓ 1,3	↓ 12,2	↓ 16,5
Cauda do núcleo caudado	↓ 3,0	↓ 15,0	↓ 28,0	↓ 15,3	↓ 1,4	↑ 18,9	↓ 14,7	↓ 26,8
Tálamo	↓ 15,4	↓ 8,3	↑ 3,4	↓ 6,8	↑ 1,4	↑ 2,0	↓ 1,5	↓ 12,0
Córtex visual	↓ 12,4	↓ 9,3	↑ 4,1	↓ 13,3	↑ 6,7	↑ 2,5	↓ 24,5	↓ 26,8

↑ = aumento; ↓ = redução

A variação de captação, em porcentagem, entre os tempos final e basal do radiofármaco [^{11}C]PK11195 para o grupo MOG/CFA são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Variação de captação, em porcentagem, do radiofármaco [^{11}C]PK11195 entre os tempos final e basal para o grupo MOG/CFA. Números em negrito indicam alterações acima de 25 %.

MOG/CFA - Final x Basal								
Volumes de interesse	M6		M7		M8		M10	
Cérebro total	↑ 42,7		↓ 18,20		↓ 31,26		↑ 27,8	
Borda lateral do córtex cingulado	↑ 46,1		↓ 4,72		↓ 22,72		↑ 30,4	
Borda inferior do córtex cingulado	↑ 45,7		↓ 10,89		↓ 21,88		↑ 35,6	
Medula espinhal	↑ 26,6		↓ 29,92		↓ 37,93		↑ 26,6	
Cerebelo	↑ 27,5		↓ 25,84		↓ 43,18		↑ 28,6	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
Comissura anterior	↑ 24,7	↑ 42,6	↓ 33,9	↑ 42,6	↓ 17,9	↓ 53,6	↑ 27,9	↑ 29,2
Corpo caloso	↑ 38,0	↑ 39,9	↓ 16,6	↓ 11,6	↓ 26,2	↓ 25,2	↑ 31,3	↑ 22,4
Córtex cingulado	↑ 35,9	↑ 49,0	↓ 6,3	↓ 15,7	↓ 21,5	↓ 17,1	↑ 33,7	↑ 28,9
Globo pálido	↑ 32,1	↑ 45,4	↓ 25,7	↓ 24,9	↓ 9,8	↓ 36,3	↑ 36,3	↑ 32,1
Cabeça do núcleo caudado	↑ 34,5	↑ 52,9	↓ 29,2	↓ 11,7	↓ 26,3	↓ 23,9	↑ 20,5	↑ 25,3
Hipocampo	↑ 50,1	↑ 57,4	↓ 28,1	↓ 26,0	↓ 23,6	↓ 23,2	↑ 26,3	↑ 31,6
Cápsula interna	↑ 34,7	↑ 51,5	↓ 29,6	↓ 16,2	↓ 24,8	↓ 29,8	↑ 28,7	↑ 29,6
Mesencéfalo	↑ 47,2	↑ 35,9	↓ 14,3	↓ 17,9	↓ 34,0	↓ 32,8	↑ 37,1	↑ 38,6
Córtex motor	↑ 28,7	↑ 30,1	↓ 19,5	↓ 18,1	↓ 29,4	↓ 6,9	↑ 39,5	↑ 26,9
Trato óptico	↑ 47,6	↑ 34,5	↓ 18,9	↓ 16,6	↓ 7,2	↓ 20,0	↑ 28,1	↑ 41,0
Córtex motor primário	↑ 31,2	↑ 51,9	↓ 7,2	↓ 14,9	↓ 34,1	↓ 20,7	↑ 34,9	↑ 27,6
Putamen	↑ 30,9	↑ 56,7	↓ 13,4	↓ 28,0	↓ 35,8	↓ 29,6	↑ 24,7	↑ 34,1
Córtex somatosensorial	↑ 32,1	↑ 51,8	↓ 11,1	↓ 8,9	↓ 42,0	↓ 12,9	↑ 38,3	↑ 28,4
Esplênio do corpo caloso	↑ 47,7	↑ 57,6	↓ 25,0	↓ 14,1	↓ 28,4	↓ 24,4	↑ 26,0	↑ 27,3
Córtex subpial	↑ 26,6	↑ 53,8	↓ 11,3	↓ 13,5	↓ 34,0	↓ 12,8	↑ 23,0	↑ 9,8
Cauda do núcleo caudado	↑ 39,0	↑ 56,5	↓ 26,4	↓ 13,1	↓ 34,9	↓ 35,7	↑ 28,2	↑ 21,0
Tálamo	↑ 35,8	↑ 39,7	↓ 32,7	↓ 18,7	↓ 35,2	↓ 37,3	↑ 25,2	↑ 29,6
Córtex visual	↑ 30,0	↑ 38,8	↓ 20,3	↓ 16,9	↓ 51,0	↓ 44,0	↑ 31,5	↑ 26,8

↑ = aumento; ↓ = redução

Para o grupo MOG/CFA foi observada uma redução significativa na captação do radiofármaco [^{11}C]PIB para a região do córtex motor esquerdo, 9,51 % ($P = 0,0083$). A figura 35 apresenta os dados obtidos para esta região.

Figura 35 - Razão de captação entre a região do córtex motor esquerdo e captação inespecífica nos grupos MOG/IFA e MOG/CFA para o $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$. ** $P < 0,01$.

4.6. Imuno-histoquímica

4.6.1. Ratos

Foi possível observar visualmente nas imagens de Iba-1 uma diferença entre a quantidade de micróglia ativada no hemisfério experimental e hemisfério controle e não foi possível observar nas imagens de GFAP alteração na quantidade de astrócitos. A figura 36 mostra imagens da imuno-histoquímica realizada com Iba-1 e GFAP nas regiões do corpo caloso e estriado de ambos os hemisférios.

Figura 36 - Histoquímica comparando o hemisfério experimental e hemisfério controle. A) Iba-1 e B) GFAP.

Não foi observado uma correlação entre Iba-1 e captação de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$. Não foi observado correlação entre captação de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ e a imuno-histoquímica com GFAP. A figura 37 mostra a correlação do $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ com os dados de Iba-1 e GFAP.

Figura 37 - Correlação entre a razão dos valores do hemisfério experimental pelo hemisfério controle da imagem final de $[^{11}\text{C}]PK11195$ com os valores obtidos na mesma região no ensaio de imuno-histoquímica, Iba-1 e GFAP, no modelo de lisolecitina em ratos. A) Iba-1; B) GFAP

4.6.2. Saguís

A imuno-histoquímica com anticorpo Iba-1, mostra a presença de micróglia ativada em algumas regiões focais, por exemplo, núcleo accumbens, corpo caloso, hipocampo e cerebelo (figura 38).

Figura 38 - Imagem ilustrativa de imuno-histoquímica com Iba-1 em saguis. A) Núcleo accumbens; B) Corpo Caloso; C) Hipocampo; D) Cerebelo.

Para a correlação da imuno-histoquímica com captação de [^{11}C]PK11195 não foram separados os animais por seus grupos e sim realizado com todos os animais juntos. Foi observado uma correlação entre os dados de Iba-1, a mesma não foi vista para o GFAP (figura 39).

Figura 39 - Correlação entre captação de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ e os dados da imuno-histoquímica adquiridos com os saguis dos grupos MOG/IFA e MOG/CFA. A) Iba-1; B) GFAP

4.7. Análise histológica

4.7.1. Rato

Com a técnica de coloração *luxol fast blue* (LFB) foi possível observar que ao final do experimento ainda havia a presença de alterações no hemisfério experimental comparado ao hemisfério controle (figura 40).

Figura 40 - Comparação do hemisfério controle com o hemisfério experimental utilizando a coloração *luxol fast blue*. Imagem do corpo caloso e estriado de rato com diferentes magnificações, 200 e 100 μm . Setas indicam a perda de mielina e infiltrado de células.

Não houve correlação entre o $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ e o LFB no corpo caloso e no estriado (figura 41).

Figura 41 - Correlação entre a captação do radiofármaco $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ com a análise histológica do corpo caloso e do estriado em modelo de rato com lipoecitina.

4.7.2. Sagui

A histologia com *luxol fast blue* no modelo de EAE em saguis mostrou focos de desmielinização nas regiões que apresentaram diferença estatística na imagem PET com o radiofármaco $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ (figura 42) e também em algumas regiões que não apresentaram diferença estatística na imagem *in vivo* realizadas com os animais dos grupos MOG/IFA e MOG/CFA (figura 43).

Figura 42 - Imagem ilustrativa da alteração da mielina nas regiões do globo pálido (A), núcleo caudado (B), corpo caloso (C), córtex cingulado (D) e córtex motor (E) do encéfalo de sagui através da técnica de *luxol fast blue* nos grupos de MOG/IFA e MOG/CFA.

Figura 43 - Histologia com *luxol fast blue* indicando regiões desmielinizadas que não deram resultados significativos na quantificação de imagem *in vivo* com o radiofármaco [^{11}C]PIB em animais dos grupos MOG/IFA e MOG/CFA.

Foi observado correlação entre os valores obtidos na captação do [^{11}C]PIB e os valores obtidos na histologia com a técnica de LFB nos dois grupos analisados, MOG/IFA e MOG/CFA (figura 44).

Figura 44 - Correlação entre o radiofármaco [^{11}C]PIB e a histologia com *luxol fast blue* em encéfalo modelos de EAE em saguis. A) Correlação do grupo MOG/IFA; B) Correlação MOG/CFA.

4.8. Autorradiografia *in vitro*

4.8.1. Ratos

As imagens de autorradiografia obtidas com [^{11}C]PIB (Figura 45) mostram variabilidade entre animais. A figura 45A mostra animal com lesão em corpo caloso e figura 45B animal sem lesão, indicando que não teve desmielinização.

Figura 45 - Autorradiografia de cortes coronais de cérebro de rato com o radiofármaco ^{11}C -PIB. A) tecido lesionado no corpo caloso, indicado por seta; B) Tecido que não apresentou desmielinização nas regiões do corpo caloso e estriado.

4.8.2. Saguís

Nas imagens de autorradiografia foi observado pontos hipocaptantes nas imagens realizadas com [^{11}C]PIB, porém, nas imagens de [^{11}C]PK11195 não foi possível observar alterações. A figura 46 mostra diferentes regiões analisadas na autorradiografia com [^{11}C]PIB e as setas indicam estes pontos diferenciados nas imagens, enquanto a figura 47 apresenta imagens de [^{11}C]PK11195 sem alterações.

Figura 46 - Imagens de autorradiografia de encéfalo de sagui com o radiofármaco [^{11}C]PIB, setas vermelhas indicam pontos hipocaptantes.

Figura 47 - Imagens de autorradiografia do encéfalo de sagui com o radiofármaco [¹¹C]PK11195

5. Discussão

Conseguimos neste trabalho ver a especificidade do radiofármaco [^{11}C]PK11195 no modelo de lisolecitina em ratos nas regiões do corpo caloso e estriado. Com o modelo de EAE em saguis vimos uma diminuição na captação de [^{11}C]PIB na região de substância branca nos animais imunizados com MOG/IFA e substância cinzenta nos animais imunizados com MOG/CFA, também observamos uma redução na captação cortical e no núcleo caudado inferior esquerdo de [^{11}C]PK11195 na imagem intermediária realizada com os animais do grupo MOG/CFA.

5.1. Produção dos Radiofármacos

A diferença do número de produções entre os radiofármacos é devido a falha em algumas sínteses. Estas falhas ocorreram devido a alguns problemas que o módulo de síntese apresentou, como por exemplo, compactação da coluna de triflato de prata ou de iodeto de sódio de forma que gerou uma pressão maior no sistema levando a interrupção no processo de síntese.

A curva de calibração realizada para os radiofármacos não apresentou valor de 0,9999. Uma das causas que podem ter levado a curva para um valor abaixo do ideal é resíduo de produto de injeções anteriores, mesmo realizando limpeza da coluna com acetona e solvente de corrida entre uma amostra e outra.

Os resultados dos testes de controles de qualidade dos produtos finais estavam dentro da conformidade, mostrando que nosso processo de produção estava adequado e os radiofármacos poderiam ser injetados para estudos *in vivo*.

5.2. Modelo de Lisolecitina em ratos

Com os resultados pudemos ver que o [^{11}C]PK11195 consegue monitorar o aparecimento e a evolução da inflamação.

Os resultados de imagem do radiofármaco [^{11}C]PK11195 para a aquisição de 4 semanas neste modelo apresenta um valor acima do basal,

indicando que ainda há neuroinflamação na região. A imuno-histoquímica dos ratos apresentou relação entre os valores de [^{11}C]PK11195 e os valores obtidos para Iba-1, indicando que havia microglia ativada em ambas as regiões onde a lisolecitina foi injetada, já para a relação entre os valores de [^{11}C]PK11195 com GFAP esta não apresentou correlação. Assim, os resultados *in vitro* mostram que a ligação do [^{11}C]PK11195 na superexpressão de TSPO *in vivo*, ocorreu na microglia ativada e não em astrócitos.

Segundo Lavis e colaboradores (2012), apesar de micróglia e astrócitos apresentarem superexpressão de TSPO, e isso ocasionar uma limitação dos dados analisados pela imagem de PET, esses macrófagos atuam com funções distintas e influenciam a progressão do quadro de forma oposta. Esta questão pode ter sido a razão de conseguirmos correlação apenas com um dos marcadores da imuno-histoquímica, Iba-1.

De Paula Faria e colaboradores (2014) avaliaram a utilização do [^{11}C]PIB e de mais dois radiofármacos, [^{11}C]MeDAS e [^{11}C]CIC, observando qual possuía as melhores características para a imagem PET em roedores nas lesões de desmielinização em esclerose múltipla. Utilizando o mesmo modelo animal utilizado neste trabalho, eles conseguiram observar diferença na captação do [^{11}C]PIB nos processos de desmielinização e remielinização.

Apesar de ser o mesmo modelo animal e utilizar o mesmo radiofármaco, o estudo realizado por eles não foi executado de forma longitudinal, cada ponto de imagem foi realizado com um grupo diferente, enquanto o nosso estudo ocorreu de forma longitudinal, na tentativa de visualizar a alteração de mielina e a presença do processo neuroinflamatório sem ter a variação entre animais.

Outro ponto a ser destacado é a redução do número de animais utilizados neste trabalho, assim, seguimos o princípio ético da redução, uma vez que a literatura já mostrou as ocorrências em cada ponto da imagem (De Paula Faria et. al. 2014), em contrapartida, devido a esta redução, não é possível relacionar os achados da imagem nos pontos intermediários com possíveis resultados em análise de histologia e imuno-histoquímica.

Os resultados obtidos por De Paula Faria e colaboradores (2014) mostram que o [^{11}C]PIB é eficiente para a quantificação da diminuição da quantidade de mielina, resultado não reproduzido em nosso estudo. É possível

argumentar que a diferença nos resultados foi devido à falta de destreza no processo de injeção da lisolecitina, pois neste trabalho algumas injeções de lisolecitina não ficaram exatamente no local desejado.

A detecção de neuroinflamação, porém, foi possível neste estudo, o que deve estar associado a injeção ter ocorrido próximo da região de interesse, assim a mielina da região quantificada não estava alterada, mas foi possível visualizar alteração microglial perto da região em que ocorreu a injeção da lisolecitina devido ao evento da entrada da agulha de injeção da substância detergente.

As regiões do estriado e do corpo caloso foram desenhadas manualmente pois como a lesão era focal, a utilização das ROIs disponíveis no Pmod[®] poderia diluir o nosso resultado (concentração radioativa média), uma vez que a lesão não abrangia toda a região, e assim não teríamos observado alteração ocorridas devido a injeção da lisolecitina.

Após a avaliação dos radiofármacos em um modelo onde a lesão ocorreria de forma focal e pensando na translação dos mesmos, partimos para um estudo em modelo mais complexo, por isso, decidimos avaliar ambos os radiofármacos em um modelo de encefalomielite autoimune experimental em primatas não humanos, onde as lesões ocorreriam de forma dispersa no sistema nervoso central tanto em substância branca quanto substância cinzenta, região não encontrada em ratos.

5.3. Encefalomielite autoimune experimental em saguis

Além da possibilidade de avaliar lesões em substância cinzenta, outra característica que aproxima o modelo de encefalomielite autoimune experimental em saguis do quadro da esclerose múltipla é a apresentação de um maior número de lesões no encéfalo, enquanto o modelo de EAE em roedores apresenta um maior número de lesões na região da medula espinhal (VAN DEN HOOGEN, 2017).

Analisando os resultados da indução do EAE nos saguis, foi possível observar alteração clínica nos animais de ambos os grupos. Quando realizada

a imunização utilizando CFA o desenvolvimento dos sinais ocorreu mais rápido quando comparado com os animais induzidos com IFA, assim como esperado (Jagessar et. al., 2013), um dado que evidencia esta agressividade é a perda de peso mais acentuada no grupo do CFA.

Além da perda de peso mais acentuada também podemos observar que o CFA é mais agressivo que o IFA olhando para o número de reimunizações necessárias ao longo da linha experimental. A maior agressividade do CFA é devido a presença de uma micobactéria inativa, *M. tuberculosis*, esta leva a uma resposta imune mais aguda nos animais, tornando este protocolo mais agressivo (t Hart, et. al., 2011).

Apesar desta maior agressividade, decidimos utilizar o CFA como adjuvante na emulsão para comparar se a maior agressividade na resposta imunológica levaria a um maior número de lesões e maior tamanho e consequentemente uma melhor visualização da desmielinização e de neuroinflamação pelo equipamento de PET que possui uma resolução espacial limitada. Analisando os resultados podemos ver que esta estratégia foi positiva, uma vez que observamos resultados significativos em região distinta da observada com a imunização utilizando o adjuvante IFA.

Para realizar a quantificação das imagens dos saguis foi necessário realizar uma normalização dos resultados, esta deu-se através da divisão dos valores obtidos na região de interesse pelos valores obtidos na captação de uma região inespecífica, músculo externo da cabeça, região escolhida por estar dentro do campo de visão do PET, 4 cm. Isso foi feito porque houve uma grande dificuldade no momento de injeção dos radiofármacos nos saguis e assim gerando uma imprecisão da quantidade real injetada de ambos os radiofármacos.

Devido à falta de VOIs pré-definidos pelo software de análise utilizado, tivemos que desenhar as VOIs manualmente nas principais regiões cerebrais.

Inicialmente realizamos uma quantificação em que consideramos o cérebro em sua totalidade para realizarmos uma avaliação do efeito global das lesões, porém, apesar de apresentar uma tendência para o grupo MOG/IFA ($P = 0,0603$), esta não apresentou diferenças significativas.

Jagessar e colaboradores (2015) realizaram um estudo em que eles observaram que os saguis que são imunizados com o adjuvante IFA apresentam um maior número de focos de desmielinização em regiões de substância branca quando comparado com animais imunizados com o adjuvante CFA, e ambos apresentam focos de desmielinização em substância cinzenta. Assim, os nossos achados de imagem com o [^{11}C]PIB vão de encontro com os dados de literatura, mostrando que quando direcionado de forma correta, este radiofármaco pode avaliar com eficiência o processo de desmielinização.

Um fator que pode ter interferido na apresentação de melhores resultados para ambos os processos de imunização é o tamanho das lesões estarem abaixo da resolução espacial do equipamento em que realizamos as imagens, que é de 1 mm, isso pode ser endossado pelos dados da histologia, onde podemos observar regiões desmielinizadas que não apresentaram uma redução significativa na captação do [^{11}C]PIB.

Stankoff e colaboradores (2011) publicou um estudo mostrando a eficiência do [^{11}C]PIB para quantificação de mielina, observando claramente a diferença entre os processos de desmielinização e remielinização. Nosso trabalho, assim como este, utiliza o [^{11}C]PIB para avaliação da mielina, e também conseguimos mostrar sua eficiência, assim, podendo ser uma importante ferramenta na avaliação dos processos da esclerose múltipla.

O modelo de EAE é induzido através do sistema linfático dos animais, células T e células B, ocasionando primariamente uma resposta inflamatória acentuada seguido de uma desmielinização primária no sistema nervoso central (Jagessar et al., 2010). Sabendo que realizamos os experimentos de forma longitudinal e não obtivemos aumento de captação significativa para o [^{11}C]PK11195 na imagem final, mas observamos diminuição significativa para o [^{11}C]PIB, uma possível causa para isso é que por ter aguardado o aparecimento de sinais clínicos para a realização da imagem final dos animais acabamos não visualizando o período de inflamação do modelo, apesar de ainda estar presente, conforme verificado com Iba-1.

Isso pode ser verificado quando olhamos para os resultados da imagem intermediária com [^{11}C]PK11195 realizada no grupo MOG/IFA, onde

apresentou resultado significativo em algumas regiões. Esta análise intermediária não foi realizada com o grupo MOG/CFA devido a rápida apresentação de sinais em alguns animais do grupo.

Em estudos futuros, ao utilizar a técnica de PET com estes radiofármacos para avaliação deste modelo pré-clínico de forma longitudinal, seria interessante a realização de imagens em pontos intermediários, anteriormente ao surgimento de sinais clínicos, assim aumentando as chances de visualizar o processo de neuroinflamação com o [^{11}C]PK11195.

A importância da realização das imagens intermediárias para a visualização do processo neuroinflamatório pode ser visto na imagem intermediária realizada com o grupo MOG/IFA que mostra a redução significativa do [^{11}C]PK11195 em algumas regiões, porém a quantificação da imagem não consegue mostrar um aumento da captação deste radiofármaco em outras regiões, assim, as células responsáveis pelo aumento da inflamação podem estar em processo de migração e o intervalo entre as imagens não foi o suficiente para conseguirmos visualizar um aumento inflamatório através da imagem.

Relacionando os achados na imuno-histoquímica com as imagens de [^{11}C]PK11195 dos saguis podemos ver que há uma correlação entre os achados, pois a imagem não apresentou resultados estatisticamente significantes, porém foi visto no teste de Iba-1 uma tendência e a mesma não foi observada no teste de GFAP, mostrando assim presença de microglia ativada.

Os achados de histologia comprovam os resultados obtidos na imagem com o [^{11}C]PIB. Com o LFB foi possível visualizar pontos desmielinizados nas mesmas regiões em que os dados da imagem de PET apresentam resultados significativos e também em regiões que não apresentaram resultados expressivos.

Para os ensaios *ex vivo* foi retirado o animal M8, pois foi realizado imagem quando este apresentou escore 1,0, porém o mesmo não foi eutanasiado esperando a apresentação de escore mais elevado, porém como ele obteve uma melhora no escore clínico, retornou para escore 0. Esperamos a apresentação de novos sinais para uma nova imagem *in vivo*, mas ao

reiniciar o processo de apresentação de sinais novamente o mesmo acabou morrendo por indução do modelo, então mantivemos as imagens adquiridas quando ele apresentou o escore 1,0, mas como os ensaios *ex vivo* não seriam representativos a este período o retiramos destes ensaios.

Ao tentarmos associar os resultados finais de imagem com o [^{11}C]PIB nos saguis e os escores dados a cada animal para a apresentação dos sinais clínicos, podemos ver que há coerência entre eles.

A substância branca é uma região cerebral que é composta por células gliais e axônios mielinizados e tem a função de transmitir um sinal de um hemisfério para o outro ou para centros inferiores do cérebro (Wu et al., 2018). O corpo caloso é a maior região responsável pela interligação e coordenação entre os dois hemisférios composta de substância branca (Kontzialis; Soares; Huisman, 2017). Durante a avaliação diária dos animais pode ser observado que as atividades dos mesmos, ao surgimento de sinais, passaram a ocorrer de forma lenta, um dos motivos que pode ter levado a esta lentidão é a não transmissão de forma eficiente entre ambos os hemisférios.

O globo pálido faz parte da rede dos gânglios da base, esta rede realiza a conexão entre as redes corticais e talâmicas, hipocampo e amígdala com os centros motores corticais e tronco encefálico (Goldberg; Bergman, 2011). Esta pode ser uma das regiões cerebrais comprometida nos animais do grupo MOG/IFA que pode ter levado os mesmos a apresentarem falhas motoras durante o período que os mesmos foram avaliados.

O núcleo caudado inferior é uma sub-região do estriado e é um dos principais núcleos de entrada para os gânglios da base, onde recebe axônios de quase todas as partes do córtex (Grahn; Parkinson; Owen, 2008). O estriado é uma região que está envolvida em processos relacionados a motivação, processamento de recompensas, aprendizado, controle motor e cognição (Larsen; Luna, 2015). Avaliando os resultados significantes obtidos para esta sub-região do estriado com o [^{11}C]PIB e os associando com o escore, 2,5 e 3,0, dos animais do grupo MOG/IFA, vimos que estão correlacionados, uma vez que o escore 2,5 foi dado para animais que apresentaram monoparesia e paraparesia e o escore 3,0 para a apresentação de paraplegia ou hemiplegia.

Estudos sugerem que a região cerebral do córtex cingulado tem um importante envolvimento no controle cognitivo, ajudam na resolução de conflitos de eventos de distração aumentando recursos para o processamento de estímulos relevantes para a execução da tarefa (Weissman et. al., 2004). Através dos sinais apresentados pelos animais do grupo MOG/IFA não foi possível analisar o quanto esta região foi comprometida, uma vez que foram observados apenas os sinais clínicos e não foram realizados testes cognitivos e testes de tomadas de decisão.

Os neurônios contidos no córtex motor e regiões conectadas a esta são ativadas em antecipação ao movimento específico a ser realizado muito antes do mesmo ocorrer, ou seja, esta região neuronal reflete processos pelos quais o cérebro planeja e executa movimentos em que há determinação de vontade (Svoboda; Li, 2018). O surgimento acelerado dos sinais clínicos no grupo do MOG/CFA pode estar relacionado diretamente com o comprometimento do córtex motor dos mesmos, uma vez que o comprometimento desta área leva a uma dificuldade de realização dos movimentos pensados, como por exemplo, alteração na forma de andar dos animais e movimentação de membros superiores e inferiores.

Uma das razões que podem ter influenciado nossos animais a terem resultados heterogêneos para a apresentação de escores foi a utilização de animais com diferentes características genéticas, animais não gêmeos, além de não conseguirmos ter uma precisão na idade dos saguis, uma vez que a aquisição ocorreu junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Visando um estudo translacional este ponto torna-se vantajoso uma vez que ele não é um modelo isogênico, assim como os ratos, e assim, tornando-se mais próximo de humanos portadores de esclerose múltipla.

Jagessar et al. (2008) publicaram um trabalho em que utilizam o modelo EAE em saguis e dentro das diversas análises realizadas pelo grupo foi utilizada a técnica de ressonância magnética. Com esta, eles observaram lesões focais na substância branca, corpo caloso, na medula espinhal e também no nervo óptico. Em nosso trabalho com o uso da técnica de imagem PET conseguimos localizar alterações na substância branca, corpo caloso,

globo pálido, núcleo caudado inferior, e substância cinzenta, córtex cingulado e córtex motor.

Somando nossos achados no modelo de EAE em saguis com os achados de lisolecitina em ratos podemos ver que para uma análise de processos de esclerose múltipla pré-clínico o [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195 possuem grande potencial para um trabalho em conjunto para avaliação de desmielinização e de neuroinflamação.

6. Conclusão

Com este trabalho conseguimos validar o uso de ambos os radiofármacos para a realização de imagens de PET utilizando o modelo de roedor e também conseguimos ver a eficiência do [^{11}C]PK11195 e do [^{11}C]PIB na quantificação de neuroinflamação e para a quantificação da mielina, respectivamente, em lesões de regiões desconhecidas nos encéfalos dos primatas não humanos. Assim, podemos concluir que a utilização em conjunto destes dois radiofármacos possui um grande potencial translacional para a análise da progressão da esclerose múltipla.

Também foi realizada a validação da produção dos radiofármacos [^{11}C]PIB e [^{11}C]PK11195 no HCFMUSP e estabelecido protocolo de aquisição de imagem PET em saguis em equipamento dedicado a pequenos animais presente no laboratório de medicina nuclear.

Conseguimos com este estudo iniciar procedimentos estereotático no LIM 43, trazer um novo modelo, modelo de encefalomielite autoimune experimental, avaliar a diferença entre a imunização realizada com o adjuvante incompleto de Freund e o adjuvante completo de Freund e utilizar primatas não humanos em nosso laboratório.

Referências bibliográficas

1. Adams RD, Kubik CS. THE MORBID ANATOMY OF THE DEMYELINATIVE DISEASES. American Journal of Medicine. 1952;12(5):510-46.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária., RDC 64 de 2009, seção III, art. 23.
3. Annavarapu RN, Kathi S, Vadla VK. Non-invasive imaging modalities to study neurodegenerative diseases of aging brain. J Chem Neuroanat. 2018.
4. Bjelobaba I, Begovic-Kupresanin V, Pekovic S, Lavrnja I. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. Journal of Neuroscience Research. 2018;96(6):1021-42.
5. Bondan EF, Lallo MA, Baz EI, Sinhorini IL, Graca DL. Ultrastructural study of the remyelinating process following local ethidium bromide injection in the brainstem of dexamethasone-immunosuppressed rats. Arquivos De Neuro-Psiquiatria. 2004;62(1):131-8.
6. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. Lancet. 2017;389(10076):1336-46.
7. CABREIRA LMB, CECCIBINI AL. Imunopatologia da Esclerose Multipla. Biosáude. 2006;2:125-44.
8. Cerami C, Iaccarino L, Perani D. Molecular Imaging of Neuroinflammation in Neurodegenerative Dementias: The Role of In Vivo PET Imaging. International Journal of Molecular Sciences. 2017;18(5):14.
9. Cohen AD, Klunk WE. Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET. Neurobiol Dis. 2014;72 Pt A:117-22.
10. Dasgupta M, Kishore N. Characterization and analysis of binding of Thioflavin T with partially folded and native states of et-lactalbumin protein by calorimetric and spectroscopic techniques. International Journal of Biological
11. Macromolecules. 2017;95:376-84.

12. Debruyne JC, Versijpt J, Van Laere KJ, De Vos F, Keppens J, Strijckmans K, et al. PET visualization of microglia in multiple sclerosis patients using C-11 PK11195. *European Journal of Neurology*. 2003;10(3):257-64.
13. Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, Pirko I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*. 2011;18(1):21-9.
14. DePaula-Silva AB, Hanak TJ, Libbey JE, Fujinami RS. Theiler's murine encephalomyelitis virus infection of SJL/J and C57BL/6J mice: Models for multiple sclerosis and epilepsy. *Journal of Neuroimmunology*. 2017;308:30-42.
15. de Paula Faria D, Copray S, Sijbesma JWA, Willemsen ATM, Buchpiguel CA, Dierckx R, et al. PET imaging of focal demyelination and remyelination in a rat model of multiple sclerosis: comparison of C-11 MeDAS, C-11 CIC and C-11 PIB. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2014;41(5):995-1003.
16. de Paula Faria D, de Vries EFJ, Sijbesma JWA, Buchpiguel CA, Dierckx R, Copray S. PET imaging of glucose metabolism, neuroinflammation and demyelination in the lysolecithin rat model for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2014;20(11):1443-52.
17. DEVELOPMENT, Laboratoy For Symbolic Cognitive. **The Marmoset MRI Standard Brain**. Disponível em: <http://brainatlas.brain.riken.jp/marmoset/modules/xoonips/listitem.php?index_id=71>. Acesso em: 03 set. 2018.
18. Files DK, Jausurawong T, Katrajian R, Danoff R. Multiple Sclerosis. *Primary Care*. 2015;42(2):159-+.
19. Fodero-Tavoletti MT, Rowe CC, McLean CA, Leone L, Li QX, Masters CL, et al. Characterization of PiB Binding to White Matter in Alzheimer Disease and Other Dementias. *Journal of Nuclear Medicine*. 2009;50(2):198-204.
20. Gafson A, Giovannoni G, Hawkes CH. The diagnostic criteria for multiple sclerosis: From Charcot to McDonald. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2012;1(1):9-14.

21. Goldberg JA, Bergman H. COMPUTATIONAL PHYSIOLOGY OF THE NEURAL NETWORKS OF THE PRIMATE GLOBUS PALLIDUS: FUNCTION AND DYSFUNCTION. *Neuroscience*. 2011;198:171-92.
22. Grahn JA, Parkinson JA, Owen AM. The cognitive functions of the caudate nucleus. *Progress in Neurobiology*. 2008;86(3):141-55.
23. Huang SL, Chang CW, Lee YH, Yang FY. Protective Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Memory Impairment and Brain Damage in a Rat Model of Vascular Dementia. *Radiology*. 2017;282(1):113-22.
24. Jagessar SA, Kap YS, Heijmans N, van Driel N, van Straalen L, Bajramovic JJ, et al. Induction of Progressive Demyelinating Autoimmune Encephalomyelitis in Common Marmoset Monkeys Using MOG(34-56) Peptide in Incomplete Freund Adjuvant. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2010;69(4):372-85.
25. Jagessar SA, Smith PA, Blezer E, Delarasse C, Pham-Dinh D, Laman JD, et al. Autoimmunity against myelin oligodendrocyte glycoprotein is dispensable for the initiation although essential for the progression of chronic encephalomyelitis in common marmosets. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2008;67(4):326-40.
26. Jagessar SA, Vierboom M, Blezer ELA, Bauer J, t Hart BA, Kap YS. An Overview of Models, Methods, and Reagents Developed for Translational Autoimmunity Research in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *Experimental Animals*. 2013;62(3):159-71.
27. Jagessar SA, Heijmans N, Blezer ELA, Bauer J, Weissert R, t Hart BA. Immune profile of an atypical EAE model in marmoset monkeys immunized with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein in incomplete Freund's adjuvant. *Journal of Neuroinflammation*. 2015;12:17.
28. Kiferle L, Politis M, Muraro PA, Piccini P. Positron emission tomography imaging in multiple sclerosis-current status and future applications. *European Journal of Neurology*. 2011;18(2):226-31.
29. Kipp M, van der Star B, Vogel DYS, Puentes F, van der Valk P, Baker D, et al. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis:

- EAE and beyond. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2012;1(1):15-28.
30. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang YM, Blomqvist G, Holt DP, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Annals of Neurology*. 2004;55(3):306-19.
 31. Kontzialis M, Soares BP, Huisman T. Lesions in the Splenium of the Corpus Callosum on MRI in Children: A Review. *Journal of Neuroimaging*. 2017;27(6):549-61.
 32. Larsen B, Luna B. In vivo evidence of neurophysiological maturation of the human adolescent striatum. *Developmental Cognitive Neuroscience*. 2015;12:74-85.
 33. Lassmann H. Experimental models of multiple sclerosis. *Revue Neurologique*. 2007;163(6-7):651-5.
 34. Lassmann H. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2013;333(1-2):1-4.
 35. Lavis S, Guillermier M, Herard AS, Petit F, Delahaye M, Van Camp N, et al. Reactive Astrocytes Overexpress TSPO and Are Detected by TSPO Positron Emission Tomography Imaging. *Journal of Neuroscience*. 2012;32(32):10809-18.
 36. Li ZB, Conti PS. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62(11):1031-51.
 37. Maas J, Binder R, Steinke W. Quantitative whole-body autoradiography: Recommendations for the standardization of the method. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2000;31(2):S15-S21.
 38. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Progressive multiple sclerosis 1 Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurology*. 2015;14(2):183-93.
 39. Mammana S, Fagone P, Cavalli E, Basile MS, Petralia MC, Nicoletti F, et al. The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis: Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3).

40. McDonald WI, Ron MA. Multiple sclerosis: the disease and its manifestations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 1999;354(1390):1615-22.
41. Miljkovic D, Spasojevic I. Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(18):2286-334.
42. Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2014;13(4-5):518-24.
43. Moccia M, Ciccarelli O. Molecular and Metabolic Imaging in Multiple Sclerosis. *Neuroimaging Clinics of North America*. 2017;27(2):343-+.
44. Moreira MA, Lana-Peixoto MA, Callegaro D, Haussen SR, da Gama PD, Gabbai AA, et al. The BCTRIMS expanded consensus on treatment of multiple sclerosis: II. The evidences for the use of glucocorticoids and immunomodulatory treatments. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria*. 2002;60(3B):875-80.
45. Nave KA, Werner HB. Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions. In: Schekman R, Lehmann R, editors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol 30. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 30. Palo Alto: Annual Reviews; 2014. p. 503-+.
46. Nelissen N, Van Laere K, Thurfjell L, Owenius R, Vandenbulcke M, Koole M, et al. Phase 1 Study of the Pittsburgh Compound B Derivative F-18-Flutemetamol in Healthy Volunteers and Patients with Probable Alzheimer Disease. *Journal of Nuclear Medicine*. 2009;50(8):1251-9.
47. Ntranos A, Lublin F. Diagnostic Criteria, Classification and Treatment Goals in Multiple Sclerosis: The Chronicles of Time and Space. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2016;16(10):8.
48. G P, C W. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 3 ed. San Diego 2005
49. Pereira A, Lacativa MCS, Pereira F, Alvarenga RMP. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2015;4(6):572-9.
50. Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *European Journal of Pharmacology*. 2015;759:182-91.

51. Rawji KS, Yong VW. The Benefits and Detriments of Macrophages/Microglia in Models of Multiple Sclerosis. *Clinical & Developmental Immunology*. 2013;13.
52. Rinaldi M, Thomas L, Mathieu P, Carabias P, Troncoso MF, Pasquini JM, et al. Galectin-1 circumvents lysolecithin-induced demyelination through the modulation of microglial polarization/phagocytosis and oligodendroglial differentiation. *Neurobiology of Disease*. 2016;96:127-43.
53. Sachs HH, Bercury KK, Popescu DC, Narayanan SP, Macklin WB. A New Model of Cuprizone-Mediated Demyelination/Remyelination. *Asn Neuro*. 2014;6(5):16.
54. Schmidt KC, Smith CB. Resolution, sensitivity and precision with autoradiography and small animal positron emission tomography: implications for functional brain imaging in animal research. *Nuclear Medicine and Biology*. 2005;32(7):719-25.
55. Shukuri M, Takashima-Hirano M, Tokuda K, Takashima T, Matsumura K, Inoue O, et al. In Vivo Expression of Cyclooxygenase-1 in Activated Microglia and Macrophages During Neuroinflammation Visualized by PET with C-11-Ketoprofen Methyl Ester. *Journal of Nuclear Medicine*. 2011;52(7):1094-101.
56. Solon EG, Schweitzer A, Stoeckli M, Prideaux B. Autoradiography, MALDI-MS, and SIMS-MS Imaging in Pharmaceutical Discovery and Development. *Aaps Journal*. 2010;12(1):11-26.
57. Stankoff B, Freeman L, Aigrot MS, Chardain A, Dolle F, Williams A, et al. Imaging Central Nervous System Myelin by Positron Emission Tomography in Multiple Sclerosis Using Methyl-C-11 -2-(4 '-Methylaminophenyl)-6-Hydroxybenzothiazole. *Annals of Neurology*. 2011;69(4):673-80.
58. Steinman L, Zamvil SS. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends in Immunology*. 2005;26(11):565-71.
59. Stumpf WE. Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(1):25-40.

60. Svoboda K, Lie N. Neural mechanisms of movement planning: motor cortex and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*. 2018;49:33-41.
61. t Hart BA, Gran B, Weissert R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends in Molecular Medicine*. 2011;17(3):119-25.
62. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurology*. 2018;17(2):162-73.
63. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2018.
64. Torkildsen O, Brunborg LA, Myhr KM, Bo L. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2008;117:72-6.
65. Vallabhajosula S. Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals for Imaging Brain Beta-Amyloid. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2011;41(4):283-99.
66. van den Hoogen WJ, Laman JD, t Hart BA. Modulation of Multiple Sclerosis and its Animal Model experimental Autoimmune encephalomyelitis by Food and Gut Microbiota. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:24.
67. Van Epps HL. Thomas Rivers and the EAE model. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;202(1):4-.
68. Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. Molecular imaging of microglia/macrophages in the brain. *Glia*. 2013;61(1):10-23.
69. Weissman DH, Gopalakrishnan A, Hazlett CJ, Woldorff MG. Dorsal anterior cingulate cortex resolves conflict from distracting stimuli by boosting attention toward relevant events. *Cerebral Cortex*. 2005;15(2):229-37.
70. Yang FY, Lu WW, Lin WT, Chang CW, Huang SL. Enhancement of Neurotrophic Factors in Astrocyte for Neuroprotective Effects in Brain Disorders Using Low-intensity Pulsed Ultrasound Stimulation. *Brain Stimulation*. 2015;8(3):465-73.
71. Zuccolotto EB, Nunes GC, Nogueira RS, Pagnussatt Neto E, Nociti JR. [Anesthetic management of a patient with multiple sclerosis - case report]. *Rev Bras Anesthesiol*. 2016;66(4):414-7.

Anexos

Anexo I

Figura 48 - Fusão de RM e PET do cérebro de rato mostrando as ROIs desenhadas nas três posições anatômicas para quantificação do corpo caloso lateralmente.

Anexo II

Figura 49 - Fusão de RM e PET de cérebro de rato mostrando as ROIs desenhadas nas três posições anatômicas para a quantificação da lesão de região do corpo caloso e estriado. Legenda: Setas brancas = corpo caloso, cabeça de seta = estriado.

Anexo III

Figura 50 - Imagem de ressonância magnética de cérebro de sagui com o desenho da ROI utilizada para a quantificação do cérebro total.

Anexo IV

Figura 51 - Região de captação inespecífica utilizada para a normalização das imagens de PET realizadas com os saguis dos grupos MOG/IFA e MOG/CFA.

Anexo V

Figura 52 - Regiões de interesse utilizadas para uma análise específica das regiões cerebrais dos saguis desenhadas a partir de dados de atlas estereotático.