

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

FERNANDA FERNANDES CRUZ

EFEITO DA CAFEÍNA E DOS RECEPTORES DE ADENOSINA NA
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR COBRE EM LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio
rerio*)

Porto Alegre
2016

FERNANDA FERNANDES CRUZ

EFEITO DA CAFEÍNA E DOS RECEPTORES DE ADENOSINA NA
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR COBRE EM LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio
rerio*)

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde, Área de
Concentração em Farmacologia
Bioquímica e Molecular, da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone

Porto Alegre
2016

C957e

Cruz, Fernanda Fernandes

Efeito da cafeína e dos receptores de adenosina na inflamação induzida por cobre em larvas de zebrafish (*Danio rerio*). / Fernanda Fernandes Cruz. – Porto Alegre, 2016.

67 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde - Faculdade de Medicina, PUCRS.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Bueno Morrone

1. Medicina. 2. Farmacologia Molecular. 3. Bioquímica. 4. Peixes - Pesquisa. 5. Cafeína. 6. Adenosina. I. Morrone, Fernanda Bueno. II. Título.

CDD 612.015

FERNANDA FERNANDES CRUZ

EFEITO DA CAFEÍNA E DOS RECEPTORES DE ADENOSINA NA
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR COBRE EM LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio
rerio*)

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde, Área de
Concentração em Farmacologia
Bioquímica e Molecular, da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Aprovada em: ____ de ____ de ____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira - PUCRS

Dra. Angélica Regina Cappellari - PUCRS

Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira - UFRGS

Suplente: Profa. Dra. Maria Martha Campos - PUCRS

Porto Alegre
2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ariclaire e Luiz Fernando, por acreditarem no meu trabalho e me apoiarem nas minhas escolhas. À minha mãe por ser a maior incentivadora dos meus estudos, e ao meu pai, por ser o meu maior exemplo de inteligência, persistência e força de vontade.

À minha orientadora Fernanda Bueno Morrone, por confiar no meu potencial e no nosso trabalho, pelo carinho e incentivo, e por me acompanhar nessa jornada de pesquisa desde a graduação.

À professora Maria Martha Campos, pelo exemplo profissional, pelo carinho, amizade e dedicação.

Ao Carlos Eduardo Leite, pelo apoio técnico, pela troca de conhecimentos desde os tempos de iniciação científica, pela amizade e parceria.

Aos colegas dos laboratórios Intox, Cultura Celular e Farmacologia Aplicada, sempre acolhedores, prestativos e amigos.

Às alunas de iniciação científica Fernanda Olicheski de Marchi e Bruna Haas Drago, pela ajuda e colaboração.

Aos colegas do laboratório ZebLab, pelo apoio técnico e principalmente pela amizade.

Aos colaboradores do projeto, que me ajudaram a alcançar os resultados e tornarem esse trabalho possível.

Aos meus amigos, Felipe Vettorato, Gabriela Vargas, Juliana Vargas, Karla Hoffman, Paula Kinast, Stephanie Pedron e Victor Hugo Pereira pela amizade de longa data.

Às colegas, Ana Paula Dagnino, Helena Filippini, Kesiane da Costa, Natália Cignachi, Natália Nicoletti, Paula Seadi, Priscila Pail e Raquel Freitas, por tornarem os dias de trabalho mais alegres, e especialmente pela nossa amizade.

Ao CNPq, à PUCRS e à FINEP pelo apoio financeiro e institucional.

Dedico este trabalho aos meus pais.

*A verdadeira viagem do
descobrimento não consiste
em procurar novas
paisagens, mas em ter novos
olhos.*

Marcel Proust

RESUMO

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe ósseo originário do Paquistão e da Índia com características anatômicas e fisiológicas homólogas aos organismos mais desenvolvidos. Possui o seu genoma mapeado, com homologia ao genoma humano, o que sugere que diversos genes envolvidos em doenças humanas podem ser coincidentes ao do genoma do zebrafish. O cobre é um metal pesado que está envolvido na produção de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela peroxidação de lípidios nas membranas, oxidação direta de proteínas, e clivagem de moléculas de DNA e RNA. Purinas (ATP, ADP e adenosina) e pirimidinas (UTP e UDP) extracelulares podem atuar como moléculas sinalizadoras endógenas exercendo diferentes efeitos fisiológicos. Para tais ligantes, existem duas famílias de receptores purinérgicos: receptores de adenosina ou P1 (P1R), e receptores P2 (P2R). Os P1R têm como ligante endógeno a adenosina, e são uma família de receptores metabotrópicos, acoplados à proteína G, e se dividem nos subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. A sinalização mediada pela adenosina está envolvida em importantes funções fisiológicas, como a modulação da liberação de neurotransmissores, plasticidade sináptica, neuroproteção em eventos isquêmicos, hipóxia e estresse oxidativo. Estudos sugerem que substâncias que interferem na sinalização adenosinérgica na hipóxia podem enfraquecer os mecanismos protetores, resultando no aumento da resposta inflamatória. A cafeína (1,3,7 – trimetilxantina) é a substância psicoativa mais consumida no mundo e é um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da cafeína na inflamação induzida por cobre em larvas de zebrafish. Os animais foram tratados com cobre na concentração de 10 µM e com outras 3 concentrações diferentes de cafeína (100 µM, 500 µM e 1 mM). Foi observado, que altas concentrações (500 µM e 1 mM) de cafeína juntamente com o cobre provocaram um aumento significativo na mortalidade das larvas ao final de 24 horas de tratamento. Para os experimentos seguintes, foram escolhidos os tempos 4 e 24 horas e a concentração de 500 µM de cafeína e 10 µM de cobre. Em 4 horas de tratamento, a cafeína foi capaz de alterar os parâmetros de comportamento avaliados. Foi demonstrado que tanto o cobre quanto a cafeína, podem exercer um efeito ansiogênico nas larvas de zebrafish após 24 horas. Para a avaliação do perfil inflamatório, foram escolhidos os marcadores de inflamação PGE₂, COX-2, TNF, IL-6 e IL-10. Foi mostrado que em 4 horas de exposição há um aumento dos níveis de PGE₂ nos grupos tratados com cobre e cafeína, mostrando um

efeito aditivo da cafeína em relação à inflamação induzida por cobre. A expressão gênica de TNF, bem como a de COX-2 foi aumentada pelo tratamento com cobre, porém, nos tratamentos com cafeína houve uma diminuição da expressão gênica de COX-2. Em 24 horas de tratamento, a cafeína induziu um aumento na expressão de COX-2, TNF, IL-6 e diminuição de IL-10. Os tratamentos com cobre e cafeína aumentaram a expressão dos 4 subtipos de receptores de adenosina principalmente após 4 horas de exposição. Isso pode ser devido ao bloqueio dos receptores pela cafeína e por uma medida fisiológica de defesa em resposta à inflamação induzida pelo cobre, visto que a adenosina, de uma forma geral, exerce um efeito anti-inflamatório. Embora a cafeína tenha induzido uma diminuição significativa da sobrevivência dos animais, quando adicionada ao tratamento com cobre, nos marcadores inflamatórios e nos parâmetros comportamentais estudados, não houve um efeito aditivo da cafeína na inflamação induzida pelo cobre. Nossos resultados sugerem que a cafeína por si só é capaz de exercer uma ação inflamatória e ansiogênica em larvas de zebrafish nos tempos e concentrações estudados.

Palavras-chave: Zebrafish; sistema purinérgico; adenosina; cobre; cafeína; inflamação.

ABSTRACT

Zebrafish (*Danio rerio*) is a bony fish originated in Pakistan and India with anatomical and physiological characteristics and its genome is homologous to the more developed organisms, which suggests that many genes involved in human diseases can be coincident to the zebrafish genome. Copper is a heavy metal involved in formation of ROS, responsible for the lipid peroxidation in the membrane, direct protein oxidation and cleavage of DNA and RNA molecules. Purines (ATP, ADP and adenosine) and pyrimidine (UTP and UDP) can act as extracellular signaling molecules, exerting different physiological effects when binding to purinergic receptors. There are two families of purinergic receptors: adenosine receptors or P1 (P1R), and P2 receptor (P2R). The P1R are a family of G protein-coupled receptors and are divided in A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ subtypes. Adenosine is the major ligand for P1R, and is involved in important physiological functions such as modulation of neurotransmitter release, synaptic plasticity, neuroprotection to ischemic events, hypoxia and oxidative stress. Studies suggest that drugs that interfere in adenosine signaling may weaken the protective mechanisms and lead to an exacerbation of the inflammatory response. Caffeine is the most widely consumed psychoactive substance in the world and is a nonselective antagonist of adenosine receptors. This study aimed to evaluate the effect of caffeine in copper-induced inflammation in zebrafish larvae. The animals were treated with copper at a concentration of 10 μ M and three different concentrations of caffeine (100 μ M, 500 μ M e 1 mM) to determine the survival rate and to define timepoints and concentrations for the following experiments. It was observed that high concentrations of caffeine combined with copper caused a significant decrease of larvae survival after 24 h of treatment. For the following experiments, we chose 4 and 24 h of exposure, 500 μ M caffeine and 10 μ M copper concentrations. After 4 h of treatment, caffeine was able to change the behavior parameters. It was shown that both copper and caffeine might have an anxiogenic effect on zebrafish larvae after 24 h exposure. For the evaluation of inflammatory profile, inflammation markers PGE₂, COX-2, TNF, IL-6 and IL-10 were chosen. In 4 hours of exposure, PGE₂ levels are increased in groups treated with copper and caffeine. Caffeine showed an additive effect on the PGE₂ release. The gene expression of TNF, as well as COX-2 was increased by copper treatment, however, in treatments with caffeine there was a reduction of COX-2 gene

expression. In 24 h of treatment, caffeine induced an increase in COX-2, TNF, IL-6 and decrease IL-10 expression. The treatment with copper and caffeine combined increased the expression of the four adenosine receptor subtypes, especially after 4 h of exposure. This may be a result of receptors blockade by caffeine, or a physiological response to inflammation induced by copper, since adenosine, in general, exerts an anti-inflammatory effect. Although caffeine markedly decreased animal survival when combined to copper, caffeine did not potentiate the inflammatory and behavioral effects induced by copper. Our results suggest that caffeine alone is able to exert inflammatory and anxiogenic actions in zebrafish larvae at the timepoints and concentrations assessed.

Keywords: Zebrafish; purinergic system; adenosine; copper; caffeine; inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imagem da migração de leucócitos em zebrafish.

Figura 2. Representação do Sistema Purinérgico.

Figura 3. Estruturas químicas da adenosina e cafeína.

LISTA DE ABREVIACÕES

ADA - Adenosina deaminase

ATP, ADP e AMP - Adenosina trifosfato, difosfato e monofosfato

CNTs - Transportadores concentrativos de nucleosídeos

COX-2 - Ciclooxigenase 2

C_{max} - Concentração plasmática máxima

E-NTPDases - Ecto-nucleosídeo-trifosfo-difosfohidrolases

Ecto-5'-NT - Ecto-5'-nucleotidase

ENTs - Transportadores equilibrativo de nucleosídeos

ERO - Espécies reativas do oxigênio

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-11 - Interleucina 11

IL-15 - Interleucina 15

IL-22 - Interleucina 22

IL-26 - Interleucina 26

IFN- γ - Interferon- γ

LPS - Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

MAPK - Proteínas quinases ativadas por mitógenos

NF- κ B - Fator de transcrição nuclear κ B

NO - Óxido nítrico

P1 - Receptor purinérgico para nucleosídeos

P2 - Receptor purinérgico para nucleotídeos

P2X - Receptor purinérgico para nucleotídeos ionotrópico

P2Y - Receptor purinérgico para nucleotídeos metabotrópico

PKC - Proteína quinase C

PGE₂ - Prostaglandina E₂

T_{1/2} - Tempo de meia vida

TNF - Fator de necrose tumoral

UDP e UTP - Uridina difosfato e trifosfato

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
Zebrafish.....	14
Inflamação induzida por cobre.....	15
Cafeína.....	17
Sistema Purinérgico e Receptores de Adenosina.....	19
Receptores de Adenosina, Inflamação e Cafeína.....	22
OBJETIVOS.....	25
Objetivo Geral.....	25
Objetivos Específicos.....	25
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
REFERÊNCIAS.....	29
ANEXOS.....	37
ANEXO A – Carta de Aprovação CEUA.....	38
ANEXO B – Manuscrito do Trabalho Experimental.....	39
ANEXO C – Comprovante de Submissão do Artigo.....	66
ANEXO D – Demais produções científicas.....	67

INTRODUÇÃO

Zebrafish

A pesquisa biomédica tem feito uso de animais para entender a patogênese de doenças humanas a nível celular e molecular, tendo os roedores como principal modelo na pesquisa pré-clínica (Lieschke e Currie, 2007). Apesar de seus pontos fortes, possuem limitações experimentais no estudo de doenças, em especial no que diz respeito a pesquisas em larga escala, como *screening* genético ou de novos fármacos (Ablain e Zon, 2013).

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe ósseo com origem no Paquistão e na Índia e conhecido no Brasil como Paulistinha (Lessman, 2011; Liu e Leach, 2011). Tem sido amplamente adotado em estudos comportamentais, toxicológicos, imunológicos (Sullivan e Kim, 2008), além de ser uma alternativa útil, de grande valor científico e de menor custo em comparação aos outros modelos animais (Zon e Peterson, 2005).

A utilização de embriões e larvas de zebrafish é propícia devido às suas características favoráveis de absorção, à fácil manutenção, ao rápido desenvolvimento, ao tamanho e à transparência do animal, à necessidade de pequenas quantidades de compostos para a realização dos ensaios, à grande quantidade de animais que podem ser estudados em um determinado tempo e o fato de que os embriões se desenvolvem fora do corpo da mãe (Berghmans et al., 2008).

Se comparados aos ensaios de cultura celular, este modelo tem como principal vantagem, a avaliação do efeito de uma determinada substância sobre um organismo completo e *in vivo* (Langheinrich, 2003). Já foi descrito que a distribuição, o metabolismo e a excreção de drogas são acessíveis no modelo de zebrafish. Além disso, podem ser observados alguns fenótipos clássicos de doenças como dor, sedação, tônus vascular, motilidade gastrointestinal, entre outros (MacRae e Peterson, 2015).

O zebrafish apresenta características anatômicas e fisiológicas homólogas aos organismos mais desenvolvidos, e possui o seu genoma mapeado, com significativa homologia ao genoma humano, sugerindo que diversos genes envolvidos em doenças humanas podem ser coincidentes ao do genoma do zebrafish (Goldsmith e Jobin, 2012).

As características do zebrafish fazem deste, um modelo útil na descoberta de novos alvos farmacológicos, podendo contribuir em várias etapas do processo de desenvolvimento de fármacos (Zon e Peterson, 2005).

Inflamação induzida por cobre

A inflamação é uma resposta adaptativa desencadeada por estímulos ou condições nocivas, tais como infecções e lesão tecidual (Medzhitov, 2008). O processo inflamatório envolve gasto de energia metabólica, dano e destruição dos tecidos do hospedeiro, e até mesmo risco de sepse, falência de múltiplos órgãos e morte. A função principal da inflamação é a resolução de infecções e o reparo de danos, para que as células retornem ao estado de homeostasia (Barton, 2008).

A inflamação aguda é caracterizada por uma resposta de curto prazo, que resulta em infiltração de leucócitos, eliminação do estímulo e reparo tecidual. Ao passo que a inflamação crônica é uma resposta prolongada que envolve destruição tecidual e, sucessivas tentativas de reparo. Tanto na resposta aguda quanto na crônica, estão envolvidas as citocinas e outros mediadores inflamatórios, como interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ (IFN- γ) e espécies reativas do oxigênio (ERO) (Dantzer et al., 2008; Martinon et al., 2010). Homólogos para uma variedade de citocinas de mamíferos, como TNF, IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-11, IL-15, IL-22, e IL-26, já foram identificados em zebrafish, (Sullivan e Kim, 2008).

O zebrafish tem sido amplamente utilizado para o estudo do sistema imune dos vertebrados, pois possui um sistema imune similar ao dos mamíferos, incluindo a presença de linfócitos T e B, células apresentadoras de antígenos, células fagocíticas e elementos da imunidade humoral (Harvie e Huttenlocher, 2015; Iwanami, 2014). As semelhanças entre o sistema imunológico, o aumento na produção de zebrafish transgênicos e *knockout* e o fato do zebrafish ter seu genoma sequenciado, impulsionou estudos que estabelecem modelos de inflamação induzidas por *Escherichia coli* (Vojtech et al., 2009; Loynes et al., 2010) e por cobre (d'Alençon et al., 2010; Leite et al., 2012).

O cobre (Cu) é um metal essencial encontrado em todos os organismos vivos e é um importante cofator catalisador de proteínas que desempenha funções biológicas fundamentais, necessárias para o crescimento e desenvolvimento (Valko et al., 2005). Este metal pesado pode participar de reações que resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), responsáveis pela peroxidação de lípidos nas membranas, oxidação direta de proteínas, e clivagem de moléculas de DNA e RNA. A exposição crônica ao cobre também está associada a desordens de metabolismo, vista na doença de

Wilson e doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (Gaetke e Chow 2003; Brenner 2013).

Olivari e colaboradores (2008) apontaram que o mecanismo de lesão provocado pelo cobre inicia através do estresse oxidativo, que lesiona os neuromastos, células ciliares da linha lateral do zebrafish. Outro estudo, de d'Alençon e colaboradores (2010), demonstrou que leucócitos migram para o foco inflamatório e que o tratamento com antioxidantes e fármacos anti-inflamatórios é capaz de reverter esta migração e reduzir a lesão induzida pelo cobre (Figura 1).

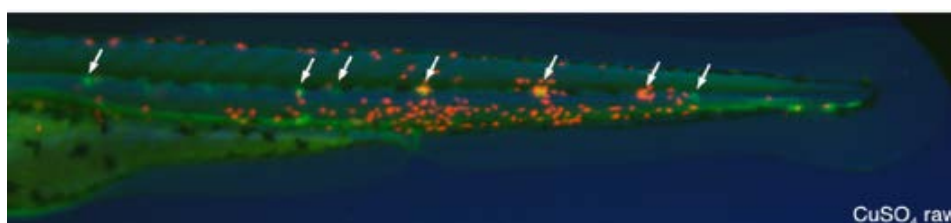


Figura 1. Imagem da migração de leucócitos em zebrafish. Os leucócitos (em vermelho) migram em direção aos neuromastos (setas brancas), sítio de inflamação, após a exposição ao cobre. Imagem retirada e adaptada de d'Aleçon et al., 2010. Reproduzida com permissão.

No estudo de Leite e colaboradores (2013) foi descrito que o tratamento com cobre resulta em uma alta mortalidade concentração-dependente, indução do estresse oxidativo, e, que a PGE_2 e outros mediadores inflamatórios, como COX-2, TNF, IL-1 β e IL-10, também estão envolvidas neste processo. Neste contexto, estes estudos demonstram que o cobre pode ser um agente inflamatório adequado para o estudo da inflamação sistêmica em larvas e embriões de zebrafish.

Cafeína

A cafeína (1,3,7 – trimetilxantina) é a substância psicoativa mais consumida no mundo. Foi descoberta no grão de café (*Coffea arabica*) na Arábia, na folha de chá (*Thea sinensis*) na China, na noz de cola (*Cola nitida*) na África Ocidental e nos grãos de cacau (*Theobroma cacao*) no México (Persad, 2011).

É um alcalóide natural, presente em diversas bebidas como o café (a maior fonte de cafeína da dieta), chás, refrigerantes, energéticos, chocolates, suplementos alimentares, alguns medicamentos e estimulantes (Gonzalez de Mejia e Ramirez-Mares, 2014). Conhecida por afetar o sono, a cognição, o aprendizado e a memória, a cafeína também influencia na regulação da frequência cardíaca, na contração e relaxamento dos músculos cardíaco e liso e na sinalização neuronal no sistema nervoso central (Rivera-Oliver e Díaz-Ríoz, 2014).

Quando absorvida, a cafeína se distribui por todo o organismo podendo atravessar a barreira hematoencefálica e a placenta, e exercer diversos efeitos fisiológicos (Temple, 2009). A Cmax é atingida 60 minutos após o consumo e seu $T_{1/2}$ de aproximadamente 5 horas (Lang et al., 2013). O metabolismo ocorre primeiramente no fígado pela isoforma CYP1A1 do citocromo P450 (Arnaud, 2011).

Evidências científicas mostram que, na população adulta saudável, o consumo moderado de cafeína (400 mg/dia) não está associado a efeitos adversos à saúde (Heckman, 2010). A ingestão de cafeína está relacionada à perda de peso, melhora da intolerância à glicose, diminuição do risco de diabetes tipo 2, melhora dos sintomas da doença de Parkinson, bem como uma menor incidência da doença, além da redução do risco de alguns tipos de câncer (Mitchell et al., 2014).

O consumo excessivo está associado a quadros de ansiedade e inquietação, dores de cabeça, taquicardia, palpitações, insônia e tremores, sendo essa dose-resposta variável entre indivíduos (Heckmann et al., 2010; Rogers et al., 2010). O $T_{1/2}$ da cafeína pode se estender em até 30 horas em casos de gravidez, fetos em desenvolvimento, mulheres em uso de anticoncepcional por via oral e em pacientes com a função hepática comprometida, sendo esses grupos de pacientes os mais suscetíveis aos efeitos tóxicos da cafeína (Lean et al., 2012; Ludwig et al., 2014).

A cafeína é um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3). Possui uma baixa afinidade pelos receptores A_3 enquanto apresenta alta

afinidade pelos receptores A_{2A} e A_{2B} (Sawynok, 2011). Já foi demonstrado que a cafeína pode inibir fosfodiesterases, promover ativação de canais de cálcio e interferir nos receptores $GABA_A$ (Ribeiro e Sebastião, 2010). Também pode influenciar na neurotransmissão mediada por glutamato, acetilcolina, epinefrina, norepinefrina, serotonina e dopamina (Pohanka e Dobes, 2013).

Sistema Purinérgico e Receptores de Adenosina

Purinas (ATP, ADP e adenosina) e pirimidinas (UTP e UDP) extracelulares podem atuar como moléculas sinalizadoras endógenas, exercendo diferentes efeitos fisiológicos. O ATP está envolvido na secreção de citocinas e no recrutamento e diferenciação de células imunes, e de forma contrária, a adenosina medeia respostas imunossupressoras com o intuito de proteger os tecidos saudáveis (Bours et al., 2006; Burnstock, 2006). Os efeitos biológicos exercidos por nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares são exercidos por meio da sensibilização de purinoreceptores (Burnstock 2006; Verkhratsky et al., 2009).

Existem duas famílias de receptores purinérgicos: receptores de adenosina ou P1 (P1R), e os receptores P2 (P2R), que reconhecem ATP, ADP, UTP e UDP. Baseado nas diferenças de suas estruturas moleculares e nos mecanismos de transdução de sinal, os P2R são classificados em duas subfamílias de receptores: receptores P2X (P2XR) ionotrópicos, e P2Y (P2YR) metabotrópicos (Ralevic and Burnstock, 1998; Burnstock, 2006). Atualmente, já foram identificados sete subtipos de P2XR (P2X1 à P2X7) e oito subtipos de P2YR (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 E P2Y14) (Burnstock, 2006).

Os receptores P2X são canais catiônicos com permeabilidade para sódio, potássio e cálcio, ativando cascatas de sinalização dependentes destes íons (Stagg e Smyth, 2010; Tsuda et al., 2010), e estão distribuídos no cérebro e nos nervos periféricos, músculo esquelético e liso, glândulas, tecido conjuntivo e células do sistema imunológico (Ralevic e Burnstock, 1998). Estes receptores têm um importante envolvimento em processos inflamatórios, como a liberação de citocinas (Alves et al., 2013).

Os receptores P2Y são acoplados à proteína G e podem ativar a fosfolipase C com consequente liberação de cálcio intracelular ou, afetar a adenilato ciclase e alterar os níveis de AMP cíclico (Burnstock, 2007). Os P2YR possuem atividades com potenciais terapêuticos, como o receptor P2Y1 envolvido na agregação plaquetária e o receptor P2Y2 em processos inflamatórios (Burnstock, 2007; von Kugelgen e Wetter, 2000).

Os P1R são uma família de receptores metabotrópicos, acoplados à proteína G e de acordo com a estrutura molecular e caracterização farmacológica, dividem-se nos subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Tricanvelli et al., 2010). Estes receptores diferem entre si na

sua afinidade pela adenosina, no tipo de proteína G que eles recrutam e nas vias de sinalização que são ativadas na célula alvo. Enquanto A_1 , A_{2A} e A_3 exibem alta afinidade, o subtipo A_{2B} apresenta uma baixa afinidade pela adenosina (Ciruela et al., 2010).

Os subtipos A_1 e A_3 são acoplados à proteína $G_{i/o}$ e quando ativados, inibem a enzima adenilato ciclase, o que diminui os níveis de AMP cíclico. A ativação dos subtipos A_{2A} e A_{2B} , que são acoplados à proteína G_s , estimulam a enzima adenilato ciclase, resultando no aumento dos níveis de AMP cíclico (Burnstock, 2007; Montinaro et al., 2013).

A concentração de adenosina encontra-se baixa no meio extracelular e aumenta em condições de estresse metabólico, como inflamação e câncer (Kumar, 2013). A sua formação ocorre por meio da degradação dos nucleotídeos por ectoenzimas, que controlam os efeitos desencadeados por essas moléculas (Antonioli et al., 2014). O ATP ou o ADP são convertidos em AMP pela enzima ecto-nucleosídeo-trifosfodifosfohidrolase (E-NTPDase, também conhecida como CD39) e em seguida a ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT, também conhecida como CD73), hidrolisa o AMP em adenosina, como mostrado na Figura 2 (Chen et al., 2013; Yegutkin, 2008).

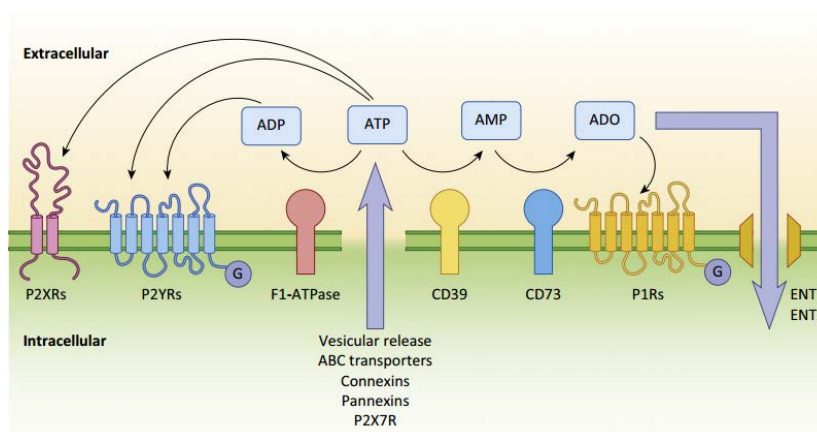


Figura 2. Representação do Sistema Purinérgico. Liberação e degradação do ATP até adenosina pelas enzimas CD39, CD73 e ligação aos seus receptores específicos. Figura retirada de Ferrari et al., 2015 e reproduzida com permissão.

A adenosina também pode ser liberada por meio de transportadores bidirecionais de nucleosídeos específicos. Esses transportadores de adenosina são classificados em transportadores equilibrativo de nucleosídeo (ENTs) e transportadores concentrativos de

nucleosídeos (CNTs) (Paes-De-Carvalho, 2002). Os transportadores do tipo equilibrativo transportam a adenosina através da membrana plasmática de acordo com o gradiente de concentração, enquanto que os concentrativos são dependentes de Na^+ e transportam a adenosina contra o gradiente de concentração (Sheth et al., 2014).

Já foi relatado que os receptores de adenosina são ativadores de canais de sódio e potássio, além de regularem a fosfolipase C, a síntese de inositol trifosfato (Fredholm, 2001), e ainda sinalizar através da via de sinalização MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Estas cascatas são vias de transdução de sinal desencadeiam respostas celulares fisiológicas ou patológicas, como inflamação, apoptose, proliferação e diferenciação celular (Jacobson e Gao, 2006; Owens e Keyse, 2007).

A sinalização mediada pela adenosina está envolvida em importantes funções fisiológicas, como a modulação da liberação de neurotransmissores, plasticidade sináptica e neuroproteção em eventos isquêmicos, hipóxia e estresse oxidativo. Este nucleosídeo regula a proliferação de células T e a produção de citocinas, além de desempenhar diferentes funções em uma variedade de tecidos, como vasodilatação e vasoconstrição de veias e artérias, inibição da lipólise e estimulação da broncoconstrição (Sheth et al., 2014).

Receptores de Adenosina, Inflamação e Cafeína

Durante condições de estresse celular, como inflamação e hipóxia, ocorrem mudanças na formação e degradação da adenosina, que resulta em um rápido aumento da concentração de adenosina extracelular. A ativação subsequente dos receptores desencadeiam modulações da resposta inflamatória e redução da injúria tecidual. A estimulação dos receptores de adenosina induz uma variedade de efeitos, incluindo vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, entre outros efeitos relacionados ao processo de inflamação (Ramakers et al., 2011).

Apresentando níveis extracelulares aumentados em patologias inflamatórias, a sinalização mediada pela adenosina mostra-se um importante alvo farmacológico durante a resolução da inflamação (Ohta e Sitkovsky, 2009). Já foi previamente descrito, que a adenosina pode atenuar a inflamação diminuindo o recrutamento de leucócitos, a adesão de células ao endotélio vascular, a produção de ERO e de outros potenciais mediadores deletérios (como NO, TNF, IL-6 e IL-12), além de induzir o aumento de IL-10 (Haskó e Cronstein, 2013).

As concentrações de adenosina podem ser reguladas por recaptação e subsequente fosforilação em AMP ou pela deaminação a inosina pela enzima adenosina deaminase (ADA). Já foi demonstrado que na inflamação induzida pelo cobre as atividades ATPásica e ADPásica não foram significativamente alteradas, mas que a atividade da ADA está reduzida, mantendo os níveis de adenosina aumentados. Além disso, também foi verificado que as subfamílias ADA 2.1, ADA 2.2 e ADA L apresentaram alteração na expressão gênica após a exposição ao cobre. A subfamília ADA 2 tem seu papel bem descrito nos eventos pró-resolutivos (Leite et al., 2013).

Os receptores de adenosina dividem-se em 4 subtipos, A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Burnstock, 2006). A expressão de subtipos de receptores P1 tem sido amplamente descrita em zebrafish. Além da expressão do receptor A₁, foram identificados dois genes para o receptor A_{2A}, nomeados A_{2A.1} e A_{2A.2}, porém, as suas diferenças funcionais ainda não estão bem estabelecidas, e até o momento, não há evidências da presença do subtipo A₃ (Boehmler et al., 2009).

De um modo geral, a ativação dos receptores A₁ apresenta ações controversas, tanto anti como pró-inflamatórias. Em estudos pré-clínicos em modelo de asma, a adenosina, via receptor A₁ promove a obstrução e exacerbação da inflamação nas vias aéreas (Antonioli et al., 2014). Os receptores A₁ podem mediar eventos associados ao

dano causado pela isquemia, incluindo a liberação de glutamato, mudança no potencial de membrana e influxo de cálcio (Paul et al., 2011). A ativação farmacológica deste subtipo de P1R diminuiu a extensão dos danos causados pela isquemia no cérebro (Cui et al., 2013), bem como o seu bloqueio provocou um aumento do dano cerebral (Cunha et al., 2005).

Estudos farmacológicos e bioquímicos estabeleceram que o receptor A_{2A} é um subtipo predominante em células imunes e a sua interação com a adenosina é capaz de inibir a inflamação pela indução de AMP cíclico. Já foi demonstrado que fármacos anti-inflamatórios como o metotrexato, a sulfasalazina e o ácido acetilsalicílico provocam o acúmulo de adenosina nos tecidos (Cronstein et al., 1994 e 1999). O receptor A_{2A} tem papel fundamental na imunoregulação do sistema adenosinérgico e a sua ativação desencadeia efeitos anti-inflamatórios em células específicas e em diferentes modelos de inflamação (Haskó e Pacher, 2008). O uso de agonistas de receptor A_{2A} tem sido estudado na asma, doença obstrutiva pulmonar crônica (DPOC), doenças renais, entre outras desordens inflamatórias (Antonioli et al., 2014).

O receptor A_{2B} está co-expresso com o receptor A_{2A} nas células imunes e o seu estímulo aumenta a produção de IL-6 e exerce um papel pró-inflamatório na asma e na colite. No entanto, estudos com camundongos *knockout* mostraram uma ação anti-inflamatória deste receptor na inflamação vascular e na exacerbação da injúria pulmonar (Kolachala et al., 2008; Sun et al., 2006). Visto que o receptor A_{2B} é expresso nas células imunes e epiteliais, esses resultados controversos podem ser causados pela diferença das respostas específicas do tipo celular para a adenosina via receptor A_{2B} durante a inflamação (Ohta e Sitkovsky, 2009).

Estudos sugerem que substâncias que interferem na sinalização adenosinérgica na hipóxia podem enfraquecer os mecanismos protetores e resultam no aumento da resposta inflamatória. A interrupção da sinalização do receptor A_{2A} , utilizando um antagonista específico, pode aumentar a inflamação e interessante há antagonistas de receptores de adenosina usuais, como a cafeína (Ohta e Stikovsky, 2001).

A cafeína tem diversos alvos bioquímicos como AMP cíclico, fosfodiesterase, fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), além dos receptores de adenosina, os quais são os seus alvos mais potentes. Sendo um antagonista não seletivo, pode se ligar aos 4 subtipos de receptores e desencadear uma série de efeitos relacionados à inflamação (Fredholm et al., 1999; Foukas et al., 2002). Possivelmente, a ligação da cafeína aos

receptores P1 e a ação antagonista, ocorre devido às semelhanças estruturais das moléculas de cafeína e adenosina (Figura 4) (Smith et al., 2006).

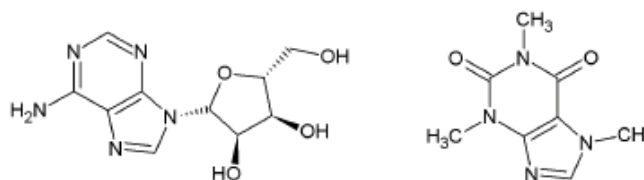


Figura 4. Estruturas químicas da adenosina e cafeína. Demonstração da semelhança estrutural da adenosina (esquerda) e da cafeína (direita). Figura retirada de Alves et al., 2009.

Foi demonstrado que o tratamento com cafeína atenuou a inflamação induzida por LPS em modelos de neuroinflamação (Brothers et al., 2010) e injúria (Sakamoto et al., 2000). Em contrapartida, o estudo de Montesinos e colaboradores (2000) descreveu que metilxantinas como a cafeína, podem reverter o efeito anti-inflamatório do metotrexato em um modelo de artrite inflamatória. A cafeína pode aumentar o dano tecidual por meio do bloqueio do receptor A_{2A} , sendo de importância clínica que a intensidade da inflamação possa ser aumentada em indivíduos consumidores de café, já que as concentrações de cafeína no sangue são altas o suficiente para bloquear o receptor A_{2A} (Otha e Stikovsky, 2001).

Visto que os estudos apresentam descrições dúbias quanto à ação da cafeína no processo inflamatório, é possível que a cafeína possa exercer papel tanto inflamatório quanto anti-inflamatório, dependendo da dose e da concentração endógena da adenosina presente no local da inflamação (Horrigan et al., 2006).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Elucidar o efeito da cafeína e dos receptores de adenosina no modelo de inflamação induzida por cobre em larvas de zebrafish.

Objetivos Específicos

- o Avaliar a sobrevivência dos animais tratados com cobre e cafeína;
- o Estudar o efeito da cafeína e da inflamação induzida pelo cobre no comportamento das larvas de zebrafish;
- o Determinar o efeito da cafeína na produção de PGE_2 após o tratamento com cobre;
- o Investigar a ação da cafeína na expressão gênica dos diferentes receptores de adenosina P1 (A_1 , A_{2A1} , A_{2A2} e A_{2B}) e de marcadores inflamatórios (TNF, IL-6; IL-10 e COX-2).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cafeína é uma das diversas substâncias presentes nos alimentos capazes de exercer efeitos fisiológicos (Mitchell et al., 2014). Embora a sua ação mais conhecida seja como estimulante do sistema nervoso central, estudos epidemiológicos apontaram que o consumo de cafeína está associado a um menor risco de desenvolvimento das doenças de Alzheimer e Parkinson, bem como de certos tipos de câncer, e melhora na função hepática. Em contrapartida, pode causar aumento da pressão sanguínea, perda óssea, ansiedade, náusea e dores de cabeça (Cano-Marquina et al., 2013; Gonzales de Mejia e Ramirez-Mares, 2014). O seu principal mecanismo de ação é como antagonista dos receptores de adenosina e diversas evidências indicam que a cafeína pode modular o funcionamento do sistema imune (Horrigan et al., 2006).

A utilização do cobre como indutor de inflamação em larvas de zebrafish está bem estabelecida, já tendo sido utilizada em estudos de avaliação da migração de neutrófilos ao sítio de inflamação (d'Aleçon et al., 2010), morte celular, estresse oxidativo (Olivari et al., 2008), e envolvimento do sistema purinérgico na inflamação (Leite et al., 2013). Nossos resultados demonstraram que o tratamento combinado com cobre e cafeína (500 μ M e 1 mM) resultou na diminuição da sobrevivência das larvas, sugerindo uma exacerbação da toxicidade do cobre provocada pela cafeína. Interessantemente, o cobre e a cafeína alteraram a expressão de TNF, COX-2, IL-6 e IL-10, de acordo com o tempo de tratamento, porém não houve um efeito aditivo da cafeína sobre a ação do cobre.

Somente na determinação dos níveis de PGE₂, o tratamento combinado com cobre e cafeína apresentou um efeito aditivo. Tal efeito foi visto apenas após 4 horas de tratamento, mostrando a importância do tempo de exposição na avaliação da inflamação. De um modo geral, a cafeína não potencializou o efeito do cobre nos marcadores inflamatórios avaliados, mas apresenta um efeito inflamatório semelhante ao deste metal pesado, o que é relevante do ponto de vista nutricional, devido o elevado consumo de cafeína na dieta.

Tanto o cobre quanto a cafeína aumentaram a expressão dos quatro subtipos diferentes de receptores P1 de adenosina, especialmente após 4 horas de tratamento. Acreditamos que a cafeína pode estar modulando a expressão dos receptores como resultado de sua ação antagonista. O aumento da expressão dos receptores purinérgicos

ocasionado após o tratamento com cobre pode ser devido a uma medida de defesa contra a injúria celular, considerando uma ação anti-inflamatória da sinalização da adenosina pelos receptores P1.

O efeito ansiogênico da cafeína já foi descrito previamente em zebrafish (Maximino et al., 2011). Foi mostrado no nosso estudo, que após 4 e 24 horas de tratamento, a cafeína é capaz de induzir um comportamento de ansiedade nas larvas de zebrafish. Larvas tratadas com cobre apresentaram alteração no comportamento semelhante ao da cafeína, indicando uma possível relação entre ansiedade e inflamação.

Deve-se ressaltar que a exposição à cafeína foi realizada nos primeiros estágios de vida do zebrafish, e que podem ocorrer diferenças no efeito do tratamento de acordo com a idade do animal. Além dos resultados envolvendo a cafeína, juntamente com o trabalho de Leite et al. (2013), nossos dados sugerem que o sistema adenosinérgico está envolvido na inflamação induzida por cobre e que este modelo pode ser utilizado no estudo de outros receptores envolvidos na inflamação, como os demais receptores purinérgicos.

Tendo em vista que a cafeína é um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina, a comparação dos seus efeitos com de agonistas e antagonistas específicos dos diferentes subtipos de receptores, poderia auxiliar na avaliação do papel de cada receptor na inflamação e nos parâmetros comportamentais. A enzima adenosina deaminase (ADA) é responsável pela hidrólise da adenosina até inosina e a adenosina quinase (AK) é responsável pela conversão da adenosina em AMP (Fredholm, 2014) e os transportadores equilibrativos de nucleosídeos (ENT) e os transportadores concentrativos de nucleosídeos (CNTs) controlam a difusão da adenosina entre os meios extra e intracelulares (Ramackers et al., 2011). Estudos posteriores podem ser realizados a fim de verificar o efeito da cafeína não somente na expressão dos receptores, mas também nas enzimas e transportadores celulares envolvidos na regulação dos níveis de adenosina.

Também deve ser ressaltado o fato de que a cafeína pode exercer influência em fosfodiesterases, na abertura de canais de cálcio e nos receptores GABA_A (Daly, 2007; Ribeiro e Sebastião, 2010), e pesquisas que abranjam tais vias de sinalização também podem auxiliar na investigação mais detalhada do efeito da cafeína nos processos inflamatórios.

De um modo geral, nossos resultados apontam um potencial efeito inflamatório da cafeína e podemos inferir que tal ação está relacionada à sua interação com os receptores de adenosina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ablain J, Zon LI. Of fish and men: using zebrafish to fight human diseases. *Trends Cell Biol.* 2013; 23(12):584-586.

Alves LA, Bezerra RJ, Faria RX, Ferreira LG, da Silva Frutuoso V. Physiological roles and potential therapeutic applications of the P2X7 receptor in inflammation and pain. *Molecules*, 2013; 5;18(9):10953-72.

Antonioli L, Csóka B, Fornai M, Colucci R, Kókai E, Blandizzi C, Haskó G. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov Today*. 2014; 19(8):1051-1068.

Arnaud MJ., Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2011; 200, 33–91.

Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 2008;118(2):413-240.

Berghmans S, Barros T, Golder Z, Gardner I, Butler P, Hill A, Fleming A, Alderton W, Roach A. Zebrafish: The future of in vivo safety pharmacology screening. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2008; 58, 147-177.

Boehmler W, Petko J, Woll M, Frey C, Thisse B, Thisse C, Canfield VA, Levenson R. Identification of zebrafish A₂ adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns*. 2009; 9:144-151.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dgnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2006; 112: 358-404.

Brenner S. Aluminum may mediate Alzheimer's disease through liver toxicity, with aberrant hepatic synthesis of ceruloplasmin and ATPase7B, the resultant excess free copper causing brain oxidation, beta-amyloid aggregation and Alzheimer disease. *Med Hypotheses* 2013; 80: 326-327.

Brothers HM, Marchalant Y, Wenk GL. Caffeine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. *Neurosci Lett*. 2010; 16;480(2):97-100.

Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacological Reviews* 2006; 58: 58-86.

Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(12):1471-1483.

Cano-Marquina A, Tarín JJ, Cano A. The impact of coffee on health. *Maturitas*. 2013; 75: 7-21.

Ciruela F, Albergaria C, Soria, no A, Cuffí L, Carbonell L, Sánchez S, Gandía J Fernández-Dueñas V. Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): behind the biology of adenosine signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1798(1):9-20.

Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets - what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov*. 2013; 12(4):265-86.

Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine. *Adv Exp Med Biol*. 1994; 370: 411-416.

Cronstein BN, Montesinos MC, Weissmann G. Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leucocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NK κ B. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1999; 96:6377-6381.

Cui M, Bai X, Li T, Chen F, Dong Q, Zhao Y, Liu X. Decreased extracellular adenosine levels lead to loss of hypoxia-induced neuroprotection after repeated episodes of exposure to hypoxia. 2013; *PLoS ONE*. 8(2): e57065.

Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A(1) receptor activation to A(2A) receptor blockade. 2005; *Purin Signal*. 1, 111-134.

d'Alencon CA, Pena OA, Wittmann C, Gallardo VE, Jones RA, Loosli F, Liebel U, Grabher C, Allende ML. A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biol* 2010; 8:151.

Daly JW. Caffeine Analogs: Biomedical impact. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64: 2153-2169.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neurociences* 2008; 9:46-56.

Ferrari D, Vitiello L, Idzko M, la Sala A. Purinergic signaling in atherosclerosis. *Trends Mol Med.* 2015; 21(3):184-92.

Foukas LC, Daniele N, Ktori C, Anderson KE, Jensen J, Shepherd PR. Direct effects of caffeine and theophylline on p110 delta and other phosphoinositide 3-kinases. Differential effects on lipid kinase and protein kinase activities. *J Biol Chem.* 2002; 277:37124–37130.

Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zwartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999; 51:83–133.

Fredholm BB, IJ AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology XXV - Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001; 53:527–552.

Fredholm BB. Adenosine - A physiological or pathophysiological agent? *J Mol Med.* 2014; 92(3):201-6.

Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003; 189:147-163.

Goldsmith JR, Jobin C. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 817341.

Gonzalez de Mejia E, Ramirez-Mares MV. Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25(10):489-492.

Harvie EA, Huttenlocher A. Neutrophils in host defense: new insights from zebrafish. *J Leukoc Biol.* 2015; 98(4):523-37.

Haskó G, Pacher P. A_{2A} receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(3):447-455.

Haskó G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol.* 2013; 8, 4:85.

Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci.* 2010; 75(3):77-87.

Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacol Ther.* 2006; 111(3):877-892.

Iwanami N. Zebrafish as a model for understanding the evolution of the vertebrate immune system and human primary immunodeficiency. *Exp Hematol.* 2014; 42(8):697-706.

Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(3):247-264.

Kolachala VL, Vijay-Kumar M, Dalmasso G, Yang D, Linden J, Wang L, Gewirtz A, Ravid K, Merlin D, Sitaramn SV. A_{2B} adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. *Gastroenterology.* 2008; 135:861-870.

Kumar V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signal.* 2013; 9(2):145-165.

Lang R, Dieminger N, Beusch A, Lee YM, Dunkel A, Suess B, Skurk T, Wahl A, Hauner H and Hofmann T, Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption, *Anal Bioanal Chem*, 2013; 405, 8487–8503.

Langheinrich U. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays* 2003; 25: 904-912.

Lean MEJ, Ashihara H, Clifford MN, Crozier A. Purine alkaloids: A focus on caffeine and related compounds in beverages, in *Teas, Cocoa and Coffee: Plant Secondary Metabolites and Health*, ed. A. Crozier, H. Ashihara and F. Tomas-Barberan, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2012; 25–44.

Leite CE, Teixeira Ada C, Cruz FF, Concatto SC, Amaral JH, Bonan CD, Campos MM, Morrone FB, Battastini AM. Analytical method for determination of nitric oxide in zebrafish larvae: toxicological and pharmacological applications. *Anal Biochem* 2012; 421:534-540.

Leite CE, Maboni LO, Cruz FF, Rosemberg DB, Zimmermann FF, Pereira TC, Bogo MR, Bonan CD, Campos MM, Morrone FB, Battastini AM. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 272(3):681-689.

Lessaman CA. The Developing Zebrafish (*Danio rerio*): A Vertebrate Model for High-throughput Screening of Chemical Libraries. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2011; 93:268–280.

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(5): 353-367.

Liu S, Leach SD. Zebrafish Models for Cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:71-93.

Loynes CA, Martin JS, Robertson A, Trushell DM, Ingham PW, Whyte MK, Renshaw SA. Pivotal Advance: Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. *J Leukoc Biol*. 2010; 87:203-212.

Ludwig IA, Clifford MN, Lean ME, Ashihara H, Crozier A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct*. 2014; 5(8):1695-1717.

MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2015; 14(10):721-731.

Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol* 2010; 40: 616-619.

Maximino C, Lima MG, Olivera KR, Picanço-Diniz DL, Herculano AM. Adenosine A₁, but not A₂, receptor blockade increases anxiety and arousal in Zebrafish. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011; 109(3):203-207.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. 2008; *Nature*. 24;454(7203):428-435.

Mitchell DC, Knight CA, Hockenberry J, Teplansky R, Hartman TJ. Beverage caffeine intakes in the U.S. *Food Chem Toxicol*. 2014; 63:136-142.

Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000; 43(3):656-663.

Montinaro A, Iannone R, Pinto A, Morello S. Adenosine receptors as potential targets in melanoma. *Pharmacol Res*. 2013; 76:34-40.

Olivari FA, Hernandez PP, Allende ML. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res* 2008; 1244:1-12.

Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414:916–920.

Ohta A, Sitkovsky M. The adenosinergic immunomodulatory drugs. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:501-506.

Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*. 2007; 26(22):3203-3213.

Paes-De-Carvalho, R. Adenosine as a signaling molecule in the retina: Biochemical and developmental aspects. *An. Acad. Bras. Cienc*. 2002, 74, 437–451.

Paul S, Elsinga PH, Ishiwata K, Dierckx RA, van Waarde A. Adenosine A(1) receptors in the central nervous system: their functions in health and disease, and possible elucidation by PET imaging. 2011; *Curr Med Chem*. 2011;18(31):4820-4835.

Persad LA, Energy drinks and the neurophysiological impact of caffeine. *Front Neurosci*. 2011; 5, 116.

- Pohanka M, Dobes P. Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(5):9873-9882.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 413-492.
- Ramakers BP, Riksen NP, van der Hoeven JG, Smits P, Pickkers P. Modulation of innate immunity by adenosine receptor stimulation. *Shock.* 2011;36(3):208-215.
- Ribeiro JA, Sebastião AM. Caffeine and adenosine. *J Alzh Dis.* 2010; 20:3-15.
- Rivera-Oliver M, Díaz-Ríos M. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: A review. *Life Sci.* 2014; 3205(14):221-225.
- Rogers PJ, Hohoff C, Heatherley SV, Mullings EL, Maxfield PJ, Evershed RP, Deckert J, Nutt DJ. Association of the anxiogenic and alerting effects of caffeine with ADORA2A and ADORA1 polymorphisms and habitual level of caffeine consumption. *Neuropsychopharmacology*, 2010; 35, 1973–1982.
- Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int J Mol Sci.* 2014; 28, 15(2):2024-2052.
- Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Mizuno S, Ozaki M, Yukawa S. Coffee and fitness suppresses lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *J Nutri Sci Vitaminol (Tokio)*, 2000; 46: 316-320.
- Sawynok J. Methylxanthines and pain. *Handb Exp Pharmacol.* 2011; 200:311-329.
- Smith DS, Gupta U, Gupta. *Caffeine Activation Theory: Effects on Health and Behavior.* 2006; CRC Press Taylor and Francis Group. Boca Raton, Florida.
- Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene.* 2010; 29(39):5346-5358
- Sullivan C, Kim CH. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 25:341-350.

Sun CX, Zhong H, Mohsenin A, Morschi E, Chunn JL, Molina JG, Belardinelli L, Zeng D, Blackburn MR. Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J Clin Invest*. 2006; 116:2173-2182.

Temple JL. Caffeine use in children: what we know, what we have to learn and why we should worry. *Neurosci.Biobehav.Rev*. 2009; 33:793–806.

Trincavelli ML, Daniele S, Martini C. Adenosine receptors: what we know and what we are learning. *Curr Top Med Chem*. 2010; 10(9):860-877.

Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Pain and purinergic signaling. *Brain Res Rev*. 2010; 63(1-2):222-232.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12(10):1161-1208.

Vojtech LN, Sanders GE, Conway C, Ostland V, Hansen JD. Host immune response and acute disease in a zebrafish model of *Francisella* pathogenesis. *Infect Immun*. 2009; 77:914-925.

Verkhatsky A, Krishtal OA, Burnstock G. Purinoceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol*. 2009; 39(3):190-208.

von Kügelgen I, Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000; 362(4-5):310-323.

Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1783(5):673-694.

Zon LI and Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005; 4: 35-44.

ANEXOS

**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO
DE ANIMAIS
(CEUA)**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 167/10 – CEUA

Porto Alegre, 22 de outubro de 2010.

Senhora Pesquisadora:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00196, intitulado: **"Neuroquímica e psicofarmacologia em Zebrafish: uma abordagem multidisciplinar"**, como complementação aos protocolos de pesquisa já aprovados por este comitê, sob números de cadastro CEUA 08/00058; 09/00117; 09/00125; 09/00129; 09/00135 e CEP 07/03854.

Sua Investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez
Coordenador-Adjunto do CEUA – PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Carla Bonan
Faculdade de Biociências
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO B - MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Os resultados do presente trabalho foram submetidos à revista Pharmacology Biochemistry and Behavior, de fator de impacto 2,7.

EFFECTS OF CAFFEINE ON BEHAVIORAL AND INFLAMMATORY CHANGES
ELICITED BY COPPER IN ZEBRAFISH LARVAE: ROLE OF ADENOSINE
RECEPTORS

^{1,2}Cruz, Fernanda Fernandes; ²Leite, Carlos Eduardo; ^{1,5}Kist, Luiza Wilges; ^{1,5}de
Oliveira, Giovanna Medeiros; ^{4,5}Bogo, Maurício Reis; Bonan, ⁴Carla Denise;
^{2,6}Campos, Maria Martha; ^{1,2,3}Morrone, Fernanda Bueno*

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto
Alegre/RS. Avenida Ipiranga, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

²Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre/RS. Avenida
Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

³Faculdade de Farmácia, PUCRS, Porto Alegre/RS. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-
900 Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre/RS. Avenida Ipiranga, 6681,
90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, PUCRS, Porto Alegre/RS.
Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

⁶Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre/RS. Avenida Ipiranga, 6681,
90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: Dr. Fernanda Bueno Morrone, Laboratório de Farmacologia
Aplicada, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga,
6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone number: 55 51 3353 3512;
Fax number: 55 51 3353 3612. E-mail address: fernanda.morrone@pucrs.br;
fbmorrone@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: This study investigated the effects of caffeine in the behavioral and inflammatory alterations caused by copper in zebrafish larvae, attempting to correlate these changes with the modulation of adenosine receptors. **Methods:** To perform a survival curve, 7 dpf larvae were exposed to 10 μM CuSO_4 , combined to different concentrations of caffeine (100 μM , 500 μM and 1 mM) for up to 24 h. We selected 4 and 24 h as treatment time-points and the concentration of 500 μM of caffeine for the remaining experiments. The behavior evaluation was done by analyzing the traveled distance, the number of entries in the center, and the length of permanence in the center and the periphery of the well. To study the inflammatory effects of caffeine, we assessed the PGE_2 levels by using UHPLC-MS/MS, and the gene expression of *TNF*, *COX-2*, *IL-6* and *IL-10* by RT-qPCR. The expression of adenosine receptors was also evaluated with RT-qPCR. **Results:** The treatment with copper showed lower survival rates only when combined with 500 μM and 1 mM of caffeine, whereas the isolated treatments did not cause significant mortality. The 4 and 24 h of exposure to 10 μM CuSO_4 plus 500 μM caffeine, changed the behavioral parameters. Caffeine also significantly altered gene expression of inflammatory markers depending on the time of exposure. The adenosine receptors expression was significantly increased, especially after 4 h exposure to copper and caffeine together or separately. **Conclusion:** Although caffeine decreased animal survival in combination with copper, it did not exacerbate the inflammatory and behavioral effects induced by copper. Our results suggest that caffeine is able to exert inflammatory and anxiogenic actions in zebrafish larvae in the times and concentrations tested, and its effects are related to adenosine receptors.

KEYWORDS

Zebrafish; purinergic system; adenosine receptors; caffeine; copper; inflammation.

1. INTRODUCTION

Zebrafish (*Danio rerio*) have been widely used in developmental biology and molecular genetic studies, as well as in high-throughput screening for toxicity of chemicals (Hill et al., 2005). Among the several characteristics that make the zebrafish a useful animal model in research are: high fecundity; low maintenance costs in comparison with mammals; rapid embryogenesis; larvae transparency that allows the visualization of tissues *in vivo*; absorption of compounds from water, and the high degree of similarity with the human genome (Chakraborti et al, 2009).

Copper (Cu) is a trace metal present in living organisms that can cycle between oxidized Cu (II) and reduced Cu (I) states (Tapiero et al., 2003). This metal is important in several biological processes, such as photosynthesis and respiration, iron metabolism, connective tissue formation, free radical scavenging and neurological function (Kuo et al., 2001). The cellular damage promoted by copper is probably secondary to the production of reactive oxygen species (ROS) (Brown and Borutaite, 2001; Valko et al., 2006), and this element is likely implicated in reactions that generate the hydroxyl radical, which may be detrimental to lipids, proteins and DNA (Halliwell and Gutteridge, 1984; Puig and Thiele, 2002). Menkes and Wilson's diseases (Strausak et al., 2001) and neurodegenerative conditions, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases have been associated to the unbalance in copper levels (Pal et al., 2014).

Adenosine is a product from the hydrolysis of adenosine triphosphate (ATP) and plays a series of pathophysiological functions throughout the body (Sheth et al, 2014). This purine nucleoside promotes its effects by binding and activating four adenosine receptors: A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃, which are G-protein-coupled cell-surface receptors (Antonioli et al., 2013; Haskó et al., 2008). Adenosine binding to A₁ and A₃ receptor subtypes leads to an inhibition of the adenylate cyclase enzyme, decreasing cyclic AMP levels. The activation of A_{2A} and A_{2B} subtypes, cause the stimulation of adenylate cyclase, resulting in increased cyclic AMP levels (Burnstock, 2007; Montinaro et al, 2013).

During inflammation, excessive damage to healthy tissues can compromise the normal functions and it must be controlled by resolution mechanisms. Adenosine is involved in these mechanisms through their anti-inflammatory effects. For instance, high extracellular levels of adenosine are observed in inflammatory diseases, such as asthma and sepsis, being an important target for the resolution of inflammation (Ohta

and Sitkovsky, 2009).

Caffeine is a natural alkaloid and one of the most used bioactive substances worldwide, being present especially in coffee beans, tea leaves, cola nuts and cocoa (Gonzalez de Mejia and Ramirez-Mares, 2014). It exerts most of its actions by antagonizing the four adenosine receptors subtypes, but also present several other targets such as calcium channels, phosphodiesterases (PDEs), GABA receptors (Ribeiro and Sebastião, 2010) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), triggering effects in inflammation, immunomodulation (Foukas et al., 2002) and tissue protection (Ohta and Sitkovsky, 2009).

Since the outcome of caffeine in inflammatory processes has not been completely elucidated, the aim of this study was to evaluate the effects of caffeine in adenosine receptors expression, behavior and inflammation, in a copper-induced inflammatory model in zebrafish larvae.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Animals*

Adult zebrafish were maintained in an aquarium system with controlled pH and temperature (Zebtec, Tecniplast, Italy), under a light/dark cycle of 14/10 hours, respectively. The animals were fed with balanced diet that combines artemia (*Artemia salina*) and commercial flocked. The fishes were mated as described by Westernfield (2000) to obtain the embryos. All protocols used in this work were performed with the consent of the Institutional Animal Care Committee (09/00135, CEUA–PUCRS). To perform the experimental procedures described in this study, we followed the “Principles of Laboratory Animal Care” from the National Institutes of Health (NIH).

2.2. *Chemicals*

Copper, added as copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) was acquired from Merck (Darmstadt, Hessen, Germany), and caffeine was purchased by Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.3. *Treatments*

Seven dpf larvae were treated with 10 μ M CuSO₄ (Leite et al., 2012 and 2013) and with 3 different concentrations of caffeine: 100 μ M, 500 μ M and 1mM. In the combined treatments, copper (10 μ M) was added to the medium 30 minutes before caffeine for induction of inflammation.

2.4. Survival Curve

For evaluation of the survival rates, the larvae mortality was verified after 0, 2, 4, 8 and 24 hours after treatments as described above. Twenty five larvae were used per group and the experiments were performed in triplicate (n = 3). The parameters observed to determine the mortality were color, locomotion, position and heart rate, using a microscope (Nikon® SMZ 1500).

2.5. Larvae Behavior

The zebrafish larvae behavior was evaluated according to Colwill and Crenton (2011). A 6-well plate was illuminated from above and filmed from below, using a high-resolution digital camera (Logitech®). The acquired recordings were analyzed by the software ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). After 4 and 24 hours of exposure to treatments, the animals were selected and transferred one per well to shoot the plate. In the videos, larvae have undergone a period of one minute for acclimation and five minutes for behavior analysis. This experiment required at least 12 larvae per group (Capiotti et al., 2013). The parameters evaluated were distance, number of entries in the center, time spent in the center and time spent in the peripheral area of the well. The last three parameters are indicative of thigmotaxis, which is related to anxious behavior (Kalueff et al., 2013).

2.6. Determination of PGE₂ by UHPLC-MS/MS

PGE₂ levels were determined at 4 and 24 hours after copper and caffeine treatments. To conduct these set of experiments, a pool of 35 larvae was required for each group of treatment (n=6). The methodology employed was similar to that described by Leite et al. (2013). Larvae homogenates were prepared in 500 μ L of phosphate buffered saline - PBS (pH 7.2–7.4). An aliquot of 400 μ L of the homogenate was transferred into a 9 mL glass tube to carry out the extraction. Eight μ L of 1 M nitric acid were added to the samples and 50 μ L of BHT 1% were added to each tube. PGE₂

extraction was made using 2 mL of hexane: ethyl acetate (1:1, v/v) and mixing for 1 minute. The samples were centrifuged at 800xg for 5 min at 4 °C. The organic phases from three extractions were collected, and under a stream of nitrogen at room temperature, were evaporated to dryness and reconstituted in 100 µL of methanol. The samples were analyzed by ultrahigh performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC–MS/MS). Five µL was injected into the UHPLC 1290/MS 6460 TQQQ — Agilent (all UHPLC components and software Mass Hunter were from Agilent Technologies®). Chromatographic separations were executed using a Zorbax Eclipse Plus Phenyl–Hexyl 4.6 × 50 mm 1.8 µm column. The flow rate of formic acid 0.1%: acetonitrile (formic acid 0.1%) 50:50 v/v mobile phase was 0.4 mL/min with a column temperature of 45°C. To detect PGE₂, an electrospray negative ionization and multiple-reaction monitoring of the transition ions was used. The collision energy was 14 V for transition 351 N 271 (quantifier) and 6 V for 351 N 315 (qualifier). The results were expressed as nanograms of PGE₂ per mg of protein.

2.7. Protein Quantification

For quantification of total protein in the homogenates of the zebrafish larvae, the method using Coomassie Blue as described by Bradford was adopted (1976).

2.8. Gene expression analysis by quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR)

Gene expression of adenosine receptor subtypes (A₁, A_{2A1}, A_{2A2} and A_{2B}), and inflammatory markers TNF (tumor necrosis factor), COX-2 (cyclooxygenase 2), IL-6 (interleukin-6) and IL-10 (interleukin-10) was determined by RT-qPCR. Using Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), the total RNA was isolated from pools of 20 zebrafish larvae with 7 dpf, after 4 and 24 hours of exposure to treatments. The quality and concentration of total RNA was estimated by A₂₆₀/A₂₈₀, and Deoxyribonuclease I (Invitrogen) was used to eliminate genomic DNA. Following the manufacturer's instructions, the cDNA was synthesized using ImProm-II[™] Reverse Transcription System (Promega) from 1 µg total RNA. SYBR[®] Green I (Invitrogen) was used to detect double-strand cDNA synthesis in the quantitative PCR. Reactions were done in a volume of 25 µL using 12.5 µL of diluted cDNA, containing a final concentration of 0.2x SYBR[®] Green I (Invitrogen), 100 µM dNTP, 1x PCR Buffer, 3 mM MgCl₂ 0.25 U Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 200 nM of each reverse and forward

primers (Table 1). The PCR cycling conditions were: an initial polymerase activation step for 5 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, 35 s at 60 °C for annealing and 15 s at 72 °C for elongation. At the end of the cycling protocol, a melting-curve analysis was included and fluorescence was measured from 60 to 99 °C, showing one single peak in all cases. *EF1α* and *Rpl13α* were used as reference genes for normalization. Relative mRNA expression levels were determined with 7500 Real-Time Systems Software v.2.0.6 (Applied Biosystems). All real time assays were carried out in quadruplicate. A reverse transcriptase negative control was included. The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR 2012.3 Software (<http://LinRegPCR.nl>) and the stability of the references genes, and the optimal number of reference genes according to the pairwise variation (V) was analyzed by GeNorm 3.5 Software (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Relative levels of mRNA expression were determined using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method (Bustin et al., 2013).

2.9. Statistical Analysis

The statistical analysis of the results of the survival curve was performed using the Kaplan-Meier method; a decrease of 20% of survival at the end of exposure time was considered as significant. In the behavior evaluation, RT-qPCR and determination of PGE₂, the results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Data are expressed as mean ± standard error, and P values less than 0.05 were considered as indicative of significance.

3. RESULTS

For survival assessment, the animals were treated for 24 hours and the survival rates were determined at 2, 4, 8 and 24 hours. At the end of 24 hours of exposure, there was no significant decrease in larvae survival in the groups treated with 10 μM CuSO₄, 100 μM caffeine, 500 μM caffeine, 1 mM caffeine, or 10 μM CuSO₄ plus 100 μM caffeine. In addition, the single treatment with 10 μM CuSO₄, 500 μM or 1 mM caffeine also failed to affect the larvae survival. However, the combined treatment of 10 μM CuSO₄ reduced the larvae survival to 60%, when combined with 500 μM caffeine, and caused death of 100% of larvae, when associated with 1 mM caffeine (0%) after 24 hours of exposure (Figure 1).

The 4 hours treatment caused a significant reduction in the travelled distance by the animals treated with 10 μM of CuSO_4 (0.091 ± 0.01), 500 μM of caffeine (0.027 ± 0.005), 10 μM of CuSO_4 and 500 μM of caffeine (0.043 ± 0.01), when compared to the control group (Figure 2 A). The number of entries in the center was also significantly decreased in the groups treated with 500 μM caffeine alone (0.25 ± 0.19) or 10 μM CuSO_4 plus 500 μM caffeine (0.083 ± 0.08), in comparison to control group (Figure 2 B). The time spent in the center was significantly decreased when compared to the control group and the 500 μM caffeine (0.73 ± 0.66), or 10 μM CuSO_4 and 500 μM caffeine (0 ± 0) (Figure 2 C). The relative time spent in the peripheral ring area of the well was increased in the groups treated with 500 μM caffeine alone (299.3 ± 0.66) or with 10 μM CuSO_4 combined to 500 μM caffeine (300 ± 0) (Figure 2 D).

After 24 hours treatment, the groups treated with 10 μM CuSO_4 , 500 μM caffeine and 10 μM CuSO_4 plus 500 μM caffeine, showed a decrease of the distance travelled by the larvae in the well when compared to control (0.089 ± 0.23 ; 0.15 ± 0.04 , 0.113 ± 0.03 , respectively) (Figure 3 A). The number of entries in the center was also decreased when compared to the control, in the groups treated with 10 μM CuSO_4 (0.53 ± 0.14), 500 μM caffeine (0.15 ± 0.1) or 10 μM CuSO_4 combined to 500 μM caffeine (0.25 ± 0.13) (Figure 3 B). Similarly, the time at the center was significantly decreased in the groups 10 μM CuSO_4 (0.84 ± 0.33), 500 μM caffeine (0.28 ± 0.23) or 500 μM caffeine plus 10 μM CuSO_4 (0.72 ± 0.35) (Figure 3 C). There was no significant difference among the experimental groups in the time spent in the periphery of the well (Figure 3 D).

To evaluate the inflammation caused by the treatments, we selected the following inflammatory markers: PGE_2 , COX-2, TNF, IL-6 and IL-10. PGE_2 levels were measured after 4 and 24 hours of treatment. The results showed a significant increase of PGE_2 levels in larvae treated with 10 μM CuSO_4 plus 500 μM caffeine ($32.19 \pm 10.67\%$), in comparison to the control, whilst the groups treated with 10 μM CuSO_4 showed lower levels of PGE_2 when compared to 500 μM caffeine group, after 4 hours of exposure (Figure 4 A). The treatment of 24 hours with 10 μM CuSO_4 elicited an increase of PGE_2 levels ($70.67 \pm 17.03\%$) in comparison to control. The other treatments did not show any significant difference among the groups (Figure 4 B).

The gene expression of COX-2, TNF, IL-6 and IL-10 was also evaluated after 4 and 24 hours of exposure. After 4 hours treatments, there was an increase in COX-2

gene expression in the groups treated with 10 μM CuSO_4 (1.2 ± 0.23), and a decrease of *COX-2* expression in the groups treated with 500 μM caffeine (0.55 ± 0.02), or 10 μM CuSO_4 associated to 500 μM caffeine (0.52 ± 0.03), in comparison to control. In relation to the group treated with 500 μM caffeine, 10 μM CuSO_4 had a significant increase of *COX-2* gene expression (Figure 5 A). After 24 hours treatment, there was also an increase in *COX-2* gene expression in the groups treated with 10 μM CuSO_4 (1.25 ± 0.11), 500 μM caffeine (1.22 ± 0.39) or 10 μM CuSO_4 and 500 μM (1.07 ± 0.15), when compared to the control group (Figure 5 A). *TNF* gene expression was also increased when the animals were treated with 10 μM CuSO_4 (3.03 ± 0.19), and also showed an increase in the combined treatment of 10 μM CuSO_4 and 500 μM caffeine (0.25 ± 4.69), when compared to control. In comparison with the group treated only with 500 μM caffeine, there was a significant increase in *TNF* expression in the group with combined treatment of copper and caffeine (Figure 5 B). The expression of *TNF* was increased after the treatment with 10 μM CuSO_4 and 500 μM caffeine (4.76 ± 0.81), when compared to the negative control and all the caffeine-treated groups (Figure 5 B). No significant changes in *IL-6* and *IL-10* gene expression were observed at 4 hours. Alternatively, there was an increase of *IL-6* expression in the 500 μM caffeine group (1.33 ± 0.12) (Figure 5 C), and a decrease of *IL-10* expression in the groups treated with 10 μM CuSO_4 (1.06 ± 0.04) or 10 μM CuSO_4 plus 500 μM caffeine (1.08 ± 0.06), when compared to the control. In comparison to 500 μM caffeine, the *IL-10* gene expression showed higher expression in the group treated only with copper (Figure 5 D).

Next, the gene expression of the adenosine receptor subtypes identified in zebrafish, namely A_1 , A_{2A1} , A_{2A2} and A_{2B} , was evaluated after 4 and 24 hours of exposure to copper and/or caffeine. After 4 hours of treatments, there was an increase in gene expression of the A_1 receptor in the groups treated with 10 μM CuSO_4 (8.67 ± 0.27), 500 μM caffeine (8.09 ± 0.67), or 10 μM CuSO_4 plus 500 μM caffeine (9.73 ± 0.86) (Figure 6 A). The same treatments caused a significant increase in the expression of A_{2A1} receptors (7.46 ± 0.52 ; 7.14 ± 0.93 ; 6.55 ± 0.6 , respectively) (Figure 6 B) and A_{2A2} (1.30 ± 0.02 ; 1.44 ± 0.09 and 1.52 ± 0.60 , respectively) (Figure 6 C). The treatment with 10 μM CuSO_4 (4.61 ± 0.39) or 10 μM CuSO_4 plus 500 μM caffeine (4.95 ± 0.46) significantly increased the expression of A_{2B} receptor (Figure 6 D). The 24 hours treatment caused an increase of A_1 , A_{2A2} and A_{2B} genes expression only in the

group treated 10 μM CuSO_4 combined with 500 μM caffeine (8.39 ± 2.2 ; 1.52 ± 0.07 and 4.95 ± 0.46 , respectively) (Figures 6 A, C and D).

4. DISCUSSION AND CONCLUSION

It has been already described that CuSO_4 can be used as an inflammatory agent for the study of inflammatory processes in zebrafish larvae (d'Aleçon et al., 2010; Olivari et al., 2008). Leite et al. (2012) demonstrated that copper, when tested at the concentration of 10 μM , did not cause a significant decrease of the zebrafish larvae survival, but it was able to induce oxidative stress, and a marked increase of inflammatory markers (Leite et al., 2013).

Caffeine is a non-selective adenosine receptor antagonist, which interferes in adenosine-mediated signaling pathways, presenting an anti-inflammatory role (Ohta and Sitkovsky, 2009; Ramakers et al., 2011). In order to verify the effect of caffeine in the inflammatory process, larvae were treated with copper combined to caffeine. Larvae treated only with copper or with any of the tested concentrations of caffeine alone did not show decreased larvae survival, while the groups that were treated with copper plus caffeine (at concentrations of 500 μM or 1 mM) had their survival rates significantly decreased. This result suggests that caffeine may be potentiating the inflammatory effect of copper, culminating in a significant death of the animals after 24 h of exposure.

The exposure to 10 μM CuSO_4 and 100 μM caffeine did not affect larvae survival, and the combination of 10 μM CuSO_4 with 1 mM caffeine decreased larvae survival to 0% in 24 hours of treatment. Thus, we tested the combination of 10 μM CuSO_4 with the intermediate concentration of 500 μM caffeine to evaluate larvae behavior, to determine PGE_2 levels, and to access cytokines and adenosine receptors gene expression.

Compelling evidence demonstrated the relationship of inflammation with neuropsychiatric disorders. It has been reported that during inflammation, pro-inflammatory cytokines can access the central nervous system and influence brain functions related to behavior, such as some pathways that control mood regulation, motor activity and anxiety (Capuron and Miller, 2011). In the 4 hours treatment, 10 μM CuSO_4 , 500 μM caffeine, or the combined treatment of 10 μM CuSO_4 and 500 μM caffeine, modified the distance traveled by the larvae. The number of entries in the

center, and the time spent at the center and periphery of the well, which is related to the anxiety behavior, were decreased in the groups treated with 500 μM caffeine, or 10 μM CuSO_4 plus 500 μM caffeine. The group treated with copper showed the number of entries and time spent in the center significantly higher, this indicates that the behavioral change is induced by caffeine and not by the copper. Of note, there was a reduction in the distance, the number of entries in the center and the time at the center of the well in all experimental groups, after 24 hours of exposure. In fact, copper showed an anxiogenic effect similar to caffeine, demonstrating that the inflammation induced by copper can alter the animal behavior and, although the larvae treated with copper or caffeine presented an anxiety-like behavior, the combination of these treatments did not show an additive effect.

It has been previously reported, that depending on the dose used, caffeine can be anxiogenic to humans (Siepmann and Joraschky, 2007) and animal models (Jain et al., 2005). Corroborating our data, Maximino et al. (2011) showed that caffeine induce an anxiety-like behavior in adult zebrafish, suggesting that this behavior is linked to the blockade of adenosine A_1 receptor subtype. We demonstrated that the treatment with caffeine increased the gene expression of A_1 receptor subtype after 4 hours of exposure, which could be a result of blocking the receptor with the antagonist. However, Maximino et al. (2011) reported an increase of locomotor activity of the animals, which was not observed in our study, since caffeine has decreased the distance traveled by the larvae in the times and concentrations evaluated. Chen et al. (2008) described that early exposure to caffeine in zebrafish caused muscle malformation, by disorganization of the muscle fibers alignment, which might influence the pattern of larvae locomotion.

Caffeine has several physiological targets, but adenosine receptors are the most relevant, especially when it binds to A_{2A} receptor, which can increase the intensity of acute inflammation (Ohta and Sitkovski, 2009; Ohta et al., 2007). To evaluate the effect of caffeine in inflammation induced by copper, we decided to determine PGE_2 levels and *COX-2*, *TNF*, *IL-6* (pro-inflammatory markers) and *IL-10* (anti-inflammatory marker) expression. The PGE_2 levels were elevated only in the combined treatment of 10 μM CuSO_4 and 500 μM caffeine after 4 hours of treatment. Therefore, it is reasonable to propose that caffeine can be potentiating the effect of copper on the release of this inflammatory marker. At 24 hours, larvae treated only with 10 μM CuSO_4 showed an increase of PGE_2 levels, suggesting that other pathways may be

involved in the influence of caffeine in PGE₂ release after prolonged exposure to copper. In agreement with our data, Leite et al. (2013) demonstrated that 10 μ M CuSO₄ treatment increased PGE₂ release in zebrafish larvae after 1 and 24 hours of exposure.

Regarding the gene expression of inflammatory markers, COX-2 expression was increased in the groups treated with 10 μ M CuSO₄ at 4 and 24 hours of treatment. Caffeine had different effects according to time of exposure, decreasing COX-2 expression at 4 hours, and increasing at 24 hours. Interestingly, the treatment with copper and caffeine caused an increase of COX-2 gene expression. The fact that it is not possible to relate PGE₂ levels and the increased COX-2 expression may be due to a possible modulation of caffeine in the enzymes that metabolize PGE₂, such as 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PDGH), or it can have an effect on the enzyme activity, and not only in their gene expression.

There was an increase of *TNF* expression at 4 hours exposure to 10 μ M CuSO₄, and a further increase when caffeine was added to copper treatment. There was a significant difference between the groups treated with copper and caffeine separately, which indicates that there is an additive effect of the combination of treatments in *TNF* expression. In 24 hours, only the treatment with 10 μ M CuSO₄ and 500 μ M caffeine increased *TNF* expression, suggesting that caffeine may be prolonging the inflammatory effects mediated by copper.

At 24 hours, only caffeine at 500 μ M was able to increase IL-6 gene expression, and this group compared to the group treated with 10 μ M CuSO₄ had even higher expression, reinforcing the notion of an inflammatory effect for caffeine. *IL-10* was reduced after 10 μ M CuSO₄ and 500 μ M caffeine, hinting that the probable decrease of *IL-10* expression is modulated by caffeine. Additionally, copper exhibited higher expression than caffeine, further indicating a potentially inflammatory action of caffeine.

Adenosine degradation is mediated intracellularly by adenosine deaminase (ADA) and adenosine kinase (AK) enzymes, and the equilibrative nucleoside transporter (ENT) controls the adenosine diffusion between extracellular and intracellular medium (Ramackers et al., 2011). We believe that caffeine is possibly binding to adenosine receptors, promoting a free adenosine accumulation, which may result in adenosine metabolism to inosine by ADA. Supporting this hypothesis, the study of Leite et al. (2013) showed a decrease of ADA activity that can occur probably

with the intention of maintaining the increased adenosine levels and thus exert their anti-inflammatory action, in zebrafish larvae treated with copper. Together, these results show that the adenosinergic system influences copper induced inflammation and caffeine may somehow interfere in adenosine signaling. Studies involving enzyme activity and using ENT inhibitors, such as dipyridamole, would be needed to better study the role of caffeine in these processes.

Our results demonstrate an increased expression of adenosine receptors depending on the time of exposure to treatments, which may be a result of the effect of caffeine as a non-selective P1 receptor antagonist. In general, the A₁ and A_{2B} receptors subtypes can present pro inflammatory and anti-inflammatory actions, while A_{2A} has anti-inflammatory effects (Antonioli et al., 2014). For a better understanding of each receptor effect on the release of each inflammatory marker and in larvae behavior, studies using specific receptor antagonists are needed. In the case of zebrafish genes for A₁ and A_{2B} receptors, and two genes for the A_{2A} receptor, named A_{2A1} and A_{2A2} have been described. However, their functional differences are not well established, and so far there is no evidence of the existence of the A₃ subtype (Boehmler et al., 2009).

Ohta et al. (2007) discloses that caffeine can exacerbate tissue damage caused by inflammation via A_{2A} receptor, and that the caffeine concentrations in the coffee consumers blood can be high enough to block A_{2A} receptors. Varani et al. (2011) demonstrated an increased gene expression of A_{2A} and A₃ receptors in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis, and also described that A_{2A} receptor activation inhibits the release of TNF, IL-1 β and IL-6. Another study that supports the hypothesis of pro-inflammatory effects of caffeine is from Montesinos et al. (2000), which reported that caffeine reverses the anti-inflammatory effects of methotrexate in rheumatoid arthritis model in rodents by A_{2A} receptor pathway.

Copper is a heavy metal that has been used to induce inflammation in zebrafish (d'Aleçon et al., 2010; Olivari et al., 2008). In general, in the times of exposure and concentrations tested in our study, caffeine did not potentiate the inflammatory effects induced by copper in zebrafish larvae. However, behavioral changes were observed, and especially an inflammatory effect by itself as compared to copper. Our study also suggests that those effects induced by copper and caffeine involve the modulation of adenosine receptor expression.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by DECIT/SCTIEMS through Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, 10/0036-5-PRONEX/700545/2008) and by the FINEP Research Grant “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” (PUCRSINFRA) #01.11.0014-00. We thank MSc. Fabiano Peres Menezes for his technical assistance, and the undergraduate students Bruna Haas Drago and Fernanda Olicheski de Marchi for laboratory support.

REFERENCES

- Antonioli L, Csóka B, Fornai M, Colucci R, Kókai E, Blandizzi C, Haskó G. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov Today*. 2014; 19(8):1051-1068.
- Altenhofen S, Zimmermann FF, Barreto LS, Bortolotto JW, Kist LW, Bogo MR, Bonan CD. Benzodiazepines alter nucleotide and nucleoside hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain. 2015; *J Neural Transm (Vienna)*. 122(8):1077-88.
- Boehmler W, Petko J, Woll M, Frey C, Thisse B, Thisse C, Canfield VA, Levenson R. Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns*. 2009; 9:144-151.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976; 72, 248-254.
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life*. 2001; 52(3-5):189-95.
- Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, et al. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods*. 2013; 10(11):1063-1067.
- Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(12):1471-1483.
- Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther*. 2011; 130(2):226-38.
- Capiotti KM, Fazenda L, Nazario LR, Menezes FP, Kist LW, Bogo MR, Da Silva RS, Wyse AT, Bonan CD. Arginine exposure alters ectonucleotidase activities and morphology of zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Int J Dev Neurosci*. 2013; 31(1):75-81.
- Chakraborty C, Hsu CH, Wen ZH, Lin CS, Agoramoorthy G. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Curr Drug Metab*. 2009; 10(2):116-24.

Chen YH, Huang YH, Wen CC, Wang YH, Chen WL, Chen LC, Tsay HJ. Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicol Teratol*. 2008; 30(5):440-7.

Colwill RM, Creton R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behav Processes*. 2011; 86(2):222-9.

d'Alençon CA, Peña OA, Wittmann C, Gallardo VE, Jones RA, Loosli F, Liebel U, Grabher C, Allende ML. A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biol*. 2010; 22;8:151.

Faikoh EN, Hong YH, Hu SY. Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*. *Fish Shellfish Immunol*. 2014; 38(1):15-24.

Foukas LC, Daniele N, Ktori C, Anderson KE, Jensen J, Shepherd PR. Direct effects of caffeine and theophylline on p110 delta and other phosphoinositide 3-kinases. Differential effects on lipid kinase and protein kinase activities. *J Biol Chem* 2002; 277:37124–37130.

Froehlicher M, Liedtke A, Groh KJ, Neuhauss SC, Segner H, Eggen RI. Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquat Toxicol*. 2009; 13;95(4):307-19. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.04.007.

Gonzalez de Mejia E, Ramirez-Mares MV. Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends Endocrinol Metab*. 2014; 25(10):489-92.

Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219:1-14.

Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7(9):759-70.

Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci*. 2005; 86(1):6-19.

Jain NS, Hirani K, Chopde CT. Reversal of caffeine-induced anxiety by neurosteroid 3-alpha-hydroxy-5-alpha-pregnane-20-one in rats. *Neuropharmacology*. 2005; 48(5):627-638.

Kalueff AV, Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM, Brimmer M, Chawla JS, Craddock C, Kyzar EJ, Roth A, Landsman S, Gaikwad S, Robinson K, Baatrup E, Tierney K, Shamchuk A, Norton W, Miller N, Nicolson T, Braubach O, Gilman CP, Pittman J, Rosemberg DB, Gerlai R, Echevarria D, Lamb E, Neuhauss SC, Weng W, Bally-Cuif L, Schneider H. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*. 2013; 10(1):70-86.

Kuo, Y.M.; Zhou, B.; Cosco, D.; Gitschier, J. The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98, 6836-6541.

Leite CE, Teixeira Ada C, Cruz FF, Concatto SC, Amaral JH, Bonan CD, Campos MM, Morrone FB, Battastini AM. Analytical method for determination of nitric oxide in zebrafish larvae: toxicological and pharmacological applications. *Anal Biochem*. 2012; 15; 421(2): 534-540.

Leite CE, Maboni L de O, Cruz FF, Rosemberg DB, Zimmermann FF, Pereira TC, Bogo MR, Bonan CD, Campos MM, Morrone FB, Battastini AM. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Nov 1;272(3):681-9.

Linbo TL, Stehr CM, Incardona JP, Scholz NL. Dissolved copper triggers cell death in the peripheral mechanosensory system of larval fish. *Environ Toxicol Chem*. 2006; 25(2):597-603.

Maximino C, Lima MG, Olivera KR, Picanço-Diniz DL, Herculano AM. Adenosine A₁, but not A₂, receptor blockade increases anxiety and arousal in Zebrafish. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011; 109(3):203-207.

Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: evidence that the antiinflammatory effects of

methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(3):656-663.

Montinaro A, Iannone R, Pinto A, Morello S. Adenosine receptors as potential targets in melanoma. *Pharmacol Res.* 2013; 76:34-40.

Ohta A, Lukashev D, Jackson EK, Fredholm BB, Sitkovsky M. 1,3,7-trimethylxanthine (caffeine) may exacerbate acute inflammatory liver injury by weakening the physiological immunosuppressive mechanism. *J Immunol.* 2007; 179(11):7431-7438.

Ohta A, Sitkovsky M. The adenosinergic immunomodulatory drugs. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:501-6.

Olivari FA, Hernandez PP, Allende ML. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res* 2008; 1244:1-12.

Puig S, Thiele DJ. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol.* 2002; 6(2):171-80.

Pal A, Jayamani J, Prasad R. An urgent need to reassess the safe levels of copper in the drinking water: lessons from studies on healthy animals harboring no genetic deficits. 2014; *Neurotoxicity*, 44:58-60.

Ramakers BP, Riksen NP, van der Hoeven JG, Smits P, Pickkers P. Modulation of innate immunity by adenosine receptor stimulation. *Shock.* 2011;36(3):208-215.

Ribeiro JA, Sebastião AM. Caffeine and adenosine. *J Alzh Dis.* 2010; 20:3-15.

Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2014; 28;15(2):2024-52.

Siepmann M, Joraschky P. Modelling anxiety in humans for drug development. *Curr Neuropharmacol.* 2007; 5(1):65-72.

Strausak D, Mercer JF, Dieter HH, Stremmel W, Multhaup G. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull.* 2001; 15;55(2):175-85.

Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. 2007; *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39(5):384-90.

Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57(9):386-98.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 10;160(1):1-40

Varani K, Padovan M, Vincenzi F, Targa M, Trotta F, Govoni M, Borea PA. A_{2A} and A₃ adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. *Arthritis Res Ther.* 2011; 13(6):R197.

Varela M, Dios S, Novoa B, Figueras A. Characterisation, expression and ontogeny of interleukin-6 and its receptors in zebrafish (*Danio rerio*). 2012; *Dev Comp Immunol.* 37(1):97-106.

Tables

Table 1. Primer sequences used in RT-qPCR experiment.

Gene	Primer Sequences (5'-3')	Acession Number (mRNA)	Reference
<i>EF1α</i>	F-CTGGAGGCCAGCTCAAACAT R-ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC	ENSDART00000023156	Tang et al., 2007
<i>Rpl13α</i>	F-TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC R-AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	NM_212784	Tang et al., 2007
<i>A₁</i> (<i>adora1</i>)	F-GTTCCTCATTTACATTGCCATTCTGC R-TGGTTGTTATCCAGTCTCTCGCTCG	NM_001128584.1	Altenhofen et al., 2015
<i>A_{2A1}</i> (<i>adora2aa</i>)	F-GCGAACTGTACGCCGAGCAGAG R-TTATTCCCAGTGAGCGGCGACTC	NM_001039815.1	Altenhofen et al., 2015
<i>A_{2A2}</i> (<i>adora2ab</i>)	F-GGATTGGGTCATGTACCTGGCCATC R-GCTGTTTCCAATGGCCAGCCTG	NM_001040036.1	Altenhofen et al., 2015
<i>A_{2B}</i> (<i>adora2b</i>)	F-GTTTGTTTCGCTCTCTGTTGGCTGC R-CTAAAAGTGACTCTGAACTCCCGAATG	NM_001039813.2	Altenhofen et al., 2015
<i>IL-6</i>	F-TCAACTTCTCCAGCGTGATG R-TCTTTCCCTCTTTTCCTCCTG	NM_001261449.1	Varela et al., 2012
<i>IL-10</i>	F-TCACGTCATGAACGAGATCC R-CCTCTTGCAATTCACCATATCC	BC163031	Faikoh et al., 2014
<i>TNF</i>	F-AGGAACAAGTGCTTATGAGCCATGC R-AAATGGAAGGCAGCGCCGAG	NM_212859	Leite et al., 2013
<i>COX-2</i>	F-AACTAGGATTCCAAGACGCAGCATC R-AAATAAGAATGATGGCCGGAAGG	ENSDART00000093609	Leite et al., 2013

Figures

Figure 1

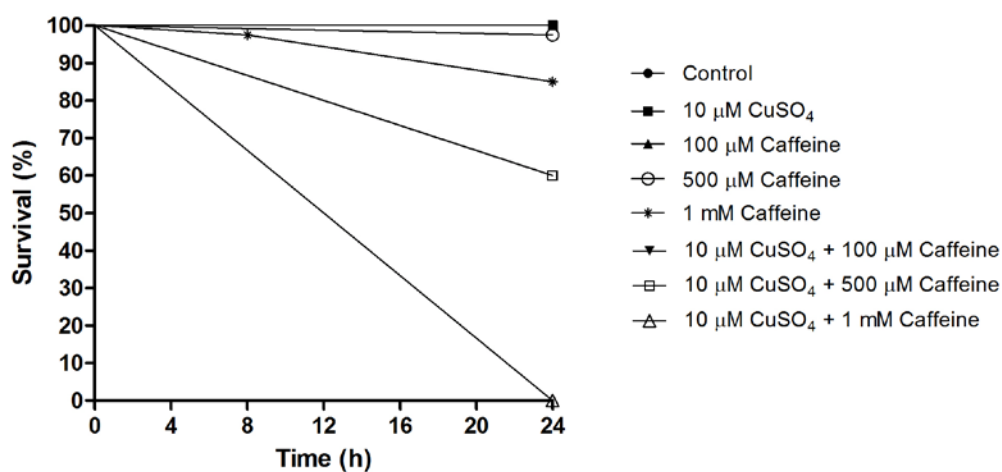


Figure 2

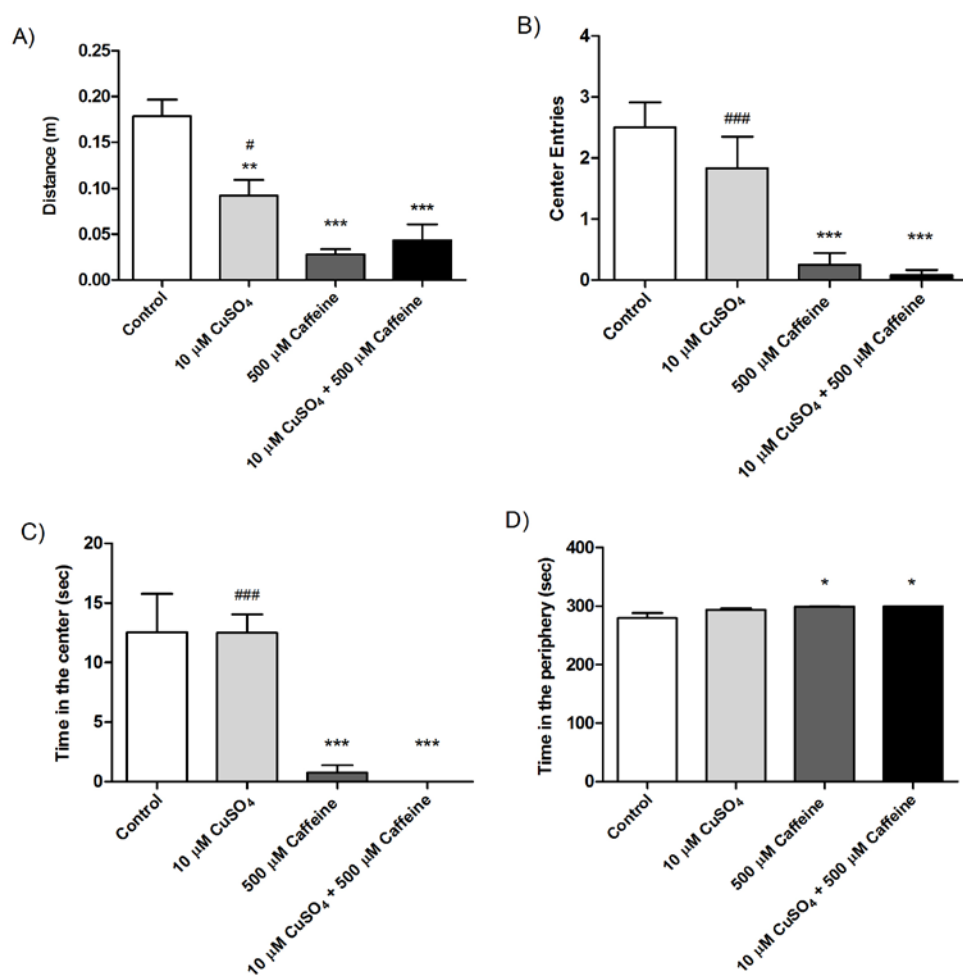


Figure 3

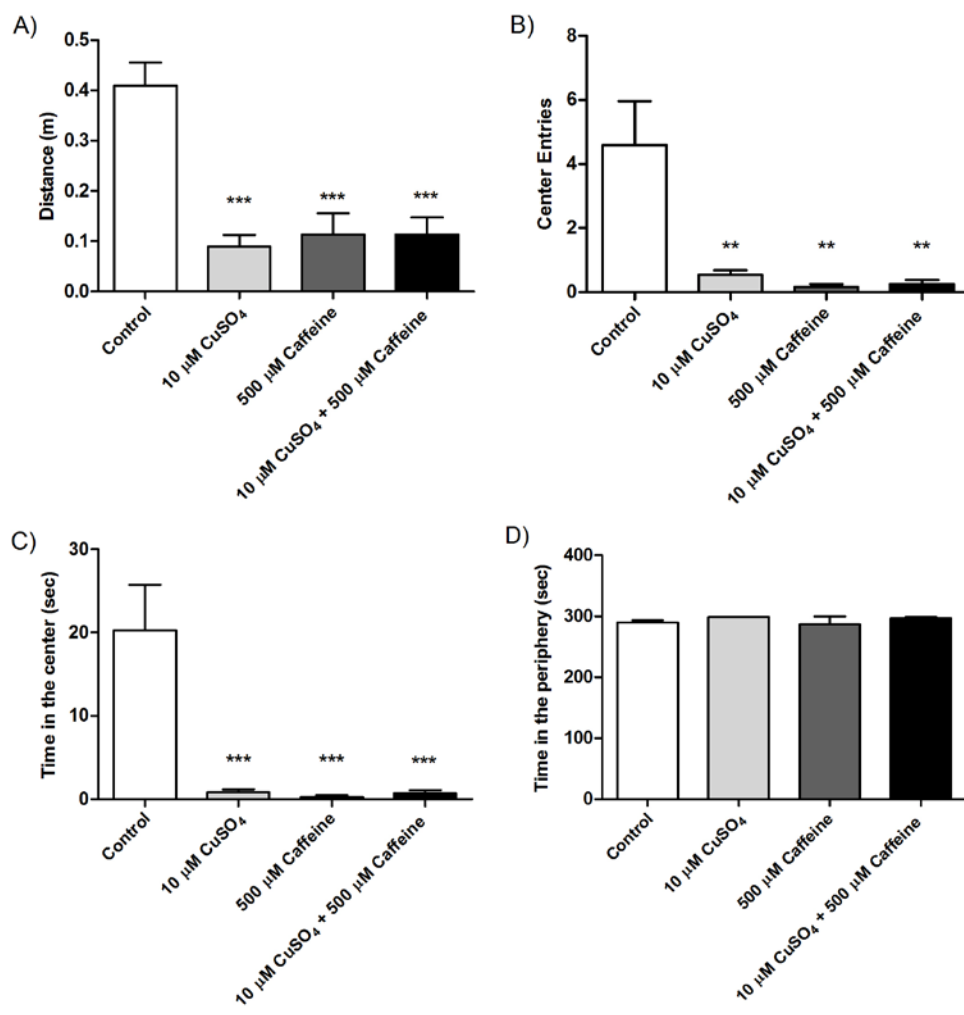


Figure 4

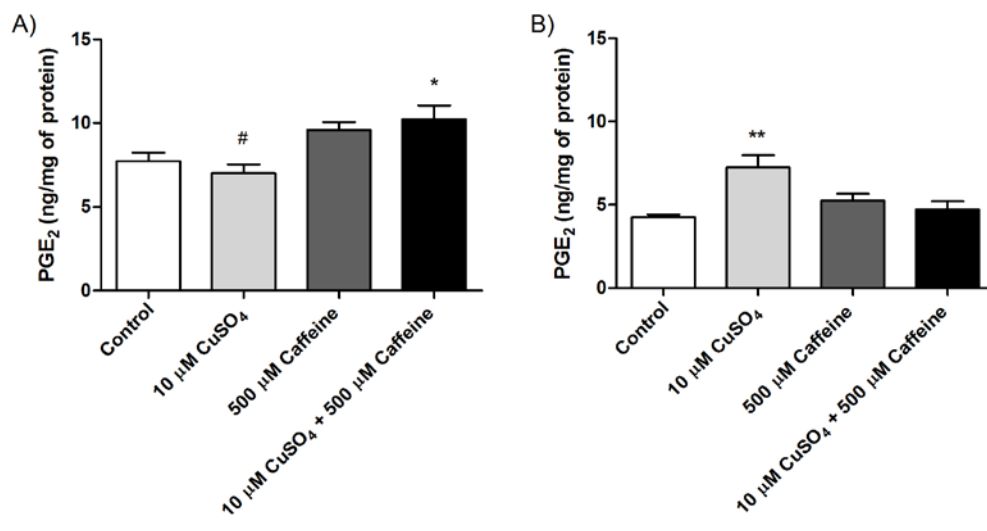


Figure 5

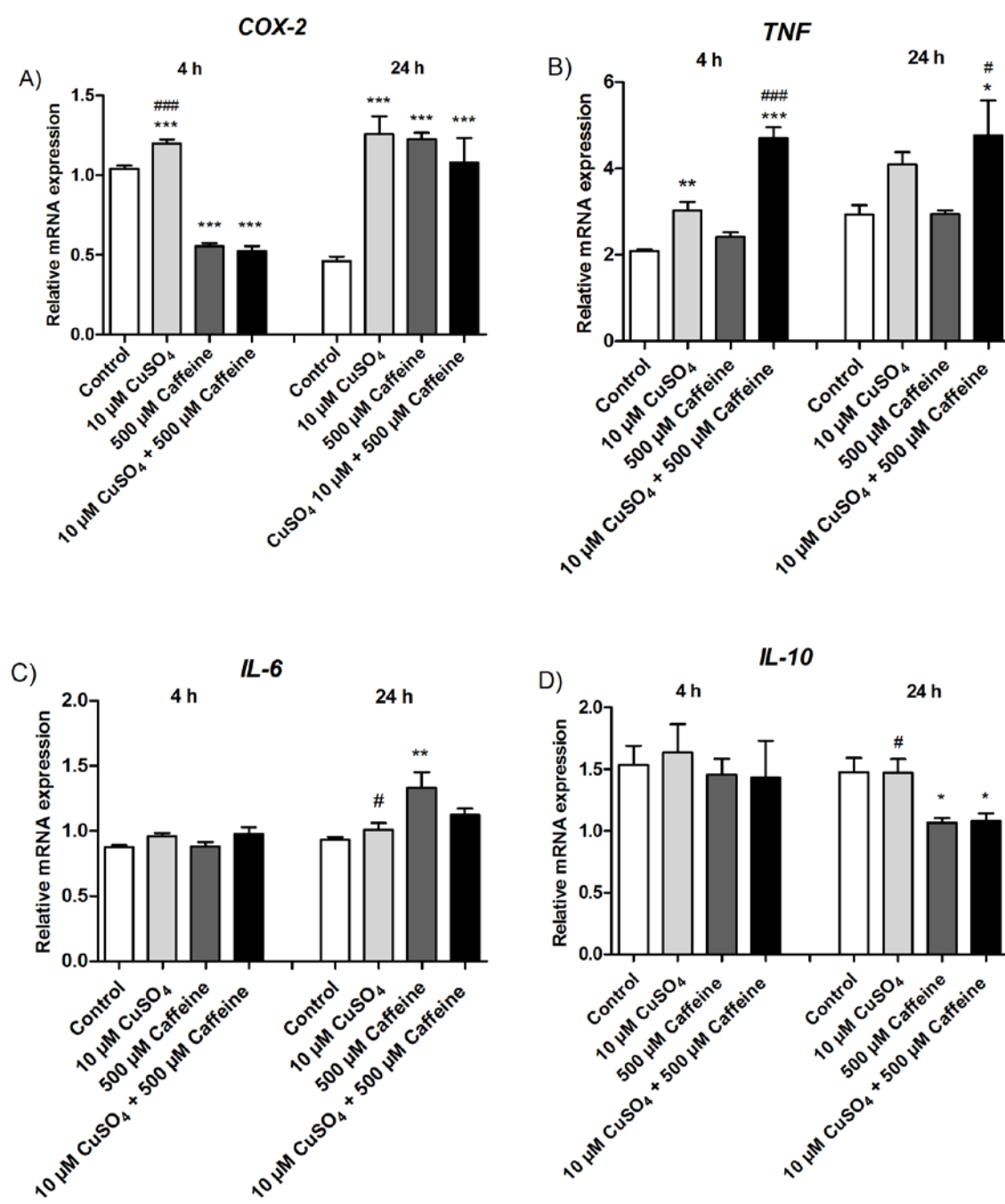
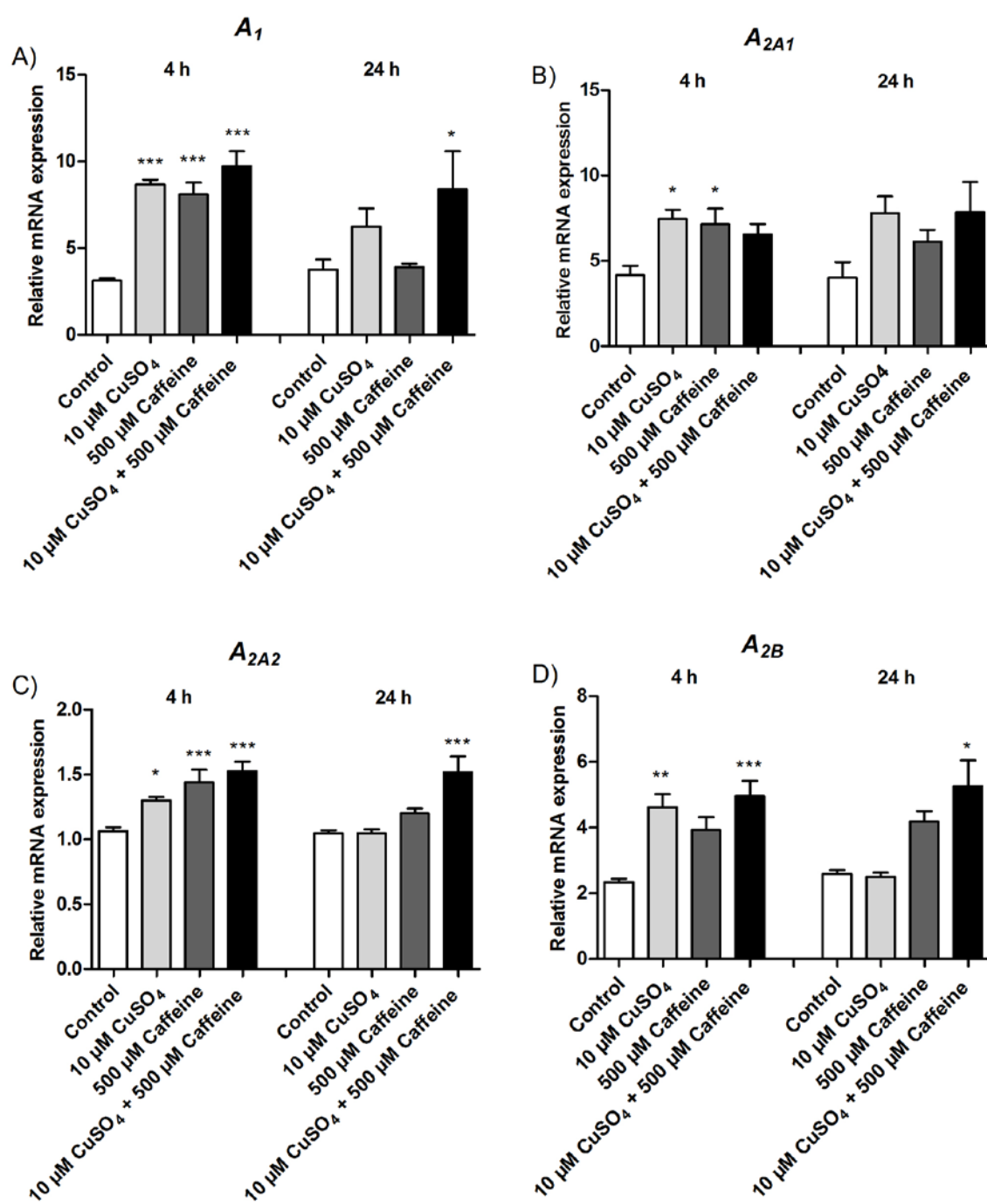


Figure 6



Legends

Figure 1. Survival curve: Evaluation of the survival of the larvae treated with copper and different caffeine concentrations. The statistical analysis of the results was performed using the Kaplan–Meier method (25 larvae per group of treatment n=3).

Figure 2. Larvae behavior after 4 h exposure: Effect of 10 μM CuSO_4 and 500 μM caffeine in larvae behavior after 4 h treatment. The parameters analyzed were travelled distance (A), center entries (B), time spent in the center (C) and time spent in the periphery of the well (D). Each bar represents the mean of at least 12 larvae per group. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Mean values significantly different from control group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 3. Larvae behavior after 24 h exposure: Effect of 10 μM CuSO_4 and 500 μM caffeine in larvae behavior after 24 h treatment. The parameters analyzed were travelled distance (A), center entries (B), time spent in the center (C) and time spent in the periphery of the well (D). Each bar represents the mean of at least 12 larvae per group. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Mean values significantly different from control group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 4. Determination of PGE_2 levels: Profile of PGE_2 release after 4 and 24 h of exposure to 10 μM CuSO_4 and 500 μM caffeine. It was required 35 larvae per group (n=6). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Mean values significantly different from

control group *P<0.05, **P<0.01, and #P<0.05 in comparison to 500 μ M caffeine group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 5. Inflammatory markers gene expression: Effect of copper and caffeine in COX-2 (A), TNF (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) gene expression, after 4 and 24 hours of exposure. It was used a pool of 20 larvae per group (n=5). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Mean values significantly different from control group *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 and #P<0.05, ##P<0.01 and ###P<0.001 in comparison to 500 μ M caffeine group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 6. Adenosine receptors gene expression: Effect of copper and caffeine in adenosine receptors subtypes A₁ (A), A_{2A1} (B), A_{2A2} (C) and A_{2B} (D) gene expression, after 4 and 24 hours of exposure. It was used a pool of 20 larvae per group (n=5). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Mean values significantly different from control group *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 and #P<0.05, ##P<0.01 and ###P<0.001 in comparison to 500 μ M caffeine group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR					Contact us Help ?	Maintenance outages until February 2016 ... more 'My EES Hub' available for consolidated users ... more
home	main menu	submit paper	guide for authors	register	change details	log out
Submissions Being Processed for Author FERNANDA BUENO MORRONE, Ph.D.					Username: fbmorrone@gmail.com Switch To: Author Go to: My EES Hub	Version: EES_2015.12
Page: 1 of 1 (1 total submissions)					Display 10 results per page.	
Action ▲	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼	
Action Links		EFFECTS OF CAFFEINE ON BEHAVIORAL AND INFLAMMATORY CHANGES ELICITED BY COPPER IN ZEBRAFISH LARVAE: ROLE OF ADENOSINE RECEPTORS	Jan 18, 2016	Jan 18, 2016	Submitted to Journal	
Page: 1 of 1 (1 total submissions)					Display 10 results per page.	

Dear Dr. FERNANDA BUENO MORRONE,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Pharmacology, Biochemistry and Behavior.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Pharmacology, Biochemistry and Behavior as an author:

<http://ees.elsevier.com/pbb/>

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

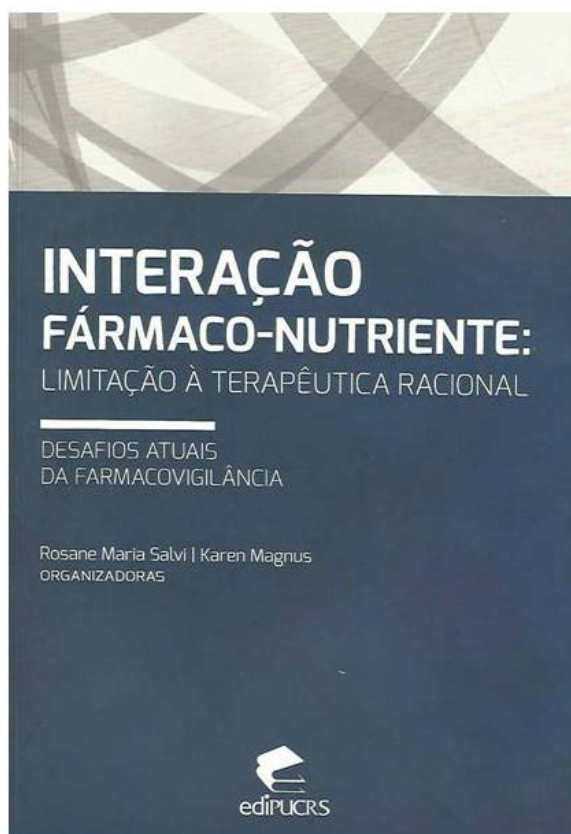
Thank you for submitting your manuscript to Pharmacology, Biochemistry and Behavior. Should you have any questions, please feel free to contact us.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Pharmacology, Biochemistry and Behavior

ANEXO D – DEMAIS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Co-autoria de capítulo do livro *Interação fármaco-nutriente: Limitação à terapêutica racional – Desafios atuais da farmacovigilância*. ediPUCRS, 2014.



Capítulo 9 – Antineoplásicos

Carina Duarte Venturini, Fernanda Fernandes Cruz,
Fernanda Bueno Morrone

Os antineoplásicos são um grupo de fármacos, em sua maioria de estreita janela terapêutica, que visam a destruir as células em divisão rápida, afetando também as células normais que proliferam rapidamente, como, por exemplo, células da mucosa oral e gastrointestinal, folículo piloso e medula óssea. Consequentemente, vários efeitos adversos se manifestam em diferentes órgãos, podendo inclusive ocasionar danos irreversíveis em alguns deles (RANG & DALE, 2012).

Como os antineoplásicos são geralmente utilizados por longos períodos, os efeitos adversos assumem grande relevância clínica, devido ao comprometimento do estado nutricional (HOWLAND & MYCEK, 2007). A tolerância desses efeitos torna-se, portanto, um fator determinante para a continuidade e o sucesso do tratamento.

Além disso, tanto a quimioterapia quanto a radioterapia alteram a capacidade absorptiva do trato gastrointestinal. No estômago, o dano maior é causado sobre as células secretoras de ácido. No intestino delgado, há encurtamento dos vilos e destruição dos microvilos (HURTER *et al.*, 1989). Nesse caso, a área de absorção fica prejudicada para fármacos e também para nutrientes. Esses fatores ganham importância clínica em se tratando principalmente de indivíduos idosos, devido ao aumento do risco de desnutrição (BROWNIE, 2006).

O tratamento do câncer inclui outras classes de fármacos além dos antineoplásicos propriamente ditos, tais como antieméticos (p. ex., ondansetrona), analgésicos (p. ex., morfina), agentes citoprotetores (p. ex., leucovorina) e ainda, fármacos e compostos bioativos usados para evitar resistência aos antineoplásicos (p. ex., verapamil, flavonóides), entre outros (ZHANG & MORRIS, 2003; RANG & DALE, 2012). O conjunto de agentes anticâncer constitui um coquetel quimioterápico com elevado risco de potenciais interações.

Devido à politerapia medicamentosa, diversas interações podem ocorrer. Algumas delas são propositalmente levadas a