



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

PAPEL DO RECEPTOR CCR2 NO PROCESSO
FISIOPATOLÓGICO DO ACÚMULO DE PROTEÍNA
AMILÓIDE BETA NO CÉREBRO: PARTICIPAÇÃO NA
NEUROINFLAMAÇÃO E NO PREJUÍZO COGNITIVO

MARIANA GISELY AMARANTE TEIXEIRA DA CUNHA

Rio de Janeiro

2015



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARIANA GISELY AMARANTE TEIXEIRA DA CUNHA

PAPEL DO RECEPTOR CCR2 NO PROCESSO FISIOPATOLÓGICO DO ACÚMULO DE PROTEÍNA AMILÓIDE BETA NO CÉREBRO: PARTICIPAÇÃO NA NEUROINFLAMAÇÃO E NO PREJUÍZO COGNITIVO

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Prof. Dra. Rachel Novaes Gomes

RIO DE JANEIRO

2015



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C972 Cunha, Mariana Gisely Amarante Teixeira da

Papel do receptor CCR2 no processo fisiopatológico do acúmulo de proteína amiloide beta no cérebro: participação na neuroinflamação e no prejuízo cognitivo / Mariana Gisely Amarante Teixeira da Cunha. – Rio de Janeiro, 2015.

xvii, 117 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 71-79

1. CCR2. 2. Cognição. 3. Alzheimer. I. Título.

CDD 572.696

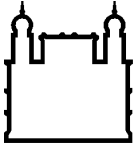


Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: MARIANA GISELY AMARANTE TEIXEIRA DA CUNHA

PAPEL DO RECEPTOR CCR2 NO PROCESSO FISIOPATOLÓGICO DO ACÚMULO DE PROTEÍNA AMILÓIDE BETA NO CÉREBRO: PARTICIPAÇÃO NA NEUROINFLAMAÇÃO E NO PREJUÍZO COGNITIVO

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Prof. Dra. Rachel Novaes Gomes

Aprovada em: ____/____/____



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Carmem Penido Monteiro - Presidente

Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol

Profa. Dra. Vanessa Estado

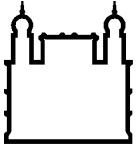
Prof. Dr. Rogério Panizzutti

Profa. Dra. Rosalia Mendez-Otero

Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2015



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Dedicatória

Dedico essa tese aos meus orientadores Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto e Dra. Rachel Novaes Gomes, ao Dr. Fernando Augusto Bozza e a todos aqueles que colaboraram com o desenvolvimento desse projeto. Dedico também ao meu esposo, Ivan Garcia Neto, por todo companheirismo nessa trajetória, aos meus pais João L. T. da Cunha e Eliane G. A. T. da Cunha. Aos meus sogros Ivan Garcia Neto e Ana Maria Derenzi Garcia. Ao meu tio/pai Heráclio Guimarães. A minha avó Wilma S. Amarante por todo seu carinho e amor incondicional. À tia Elsa Guimarães por seu carinho e por sua batalha contra o Alzheimer e por todo aprendizado que foi fundamental para o meu desenvolvimento como pessoa. Dedico essa tese a todos meus familiares e amigos.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Agradecimentos

Em primeiro lugar eu gostaria de agradecer a Deus, por ter me selecionado entre tantas pessoas. Só o fato de estar aqui, a oportunidade de estar vivo é uma dádiva. Sempre me pergunto por que fui escolhida e direcionada para fazer pesquisa, e sempre vem a certeza em meu coração que a pesquisa tem um propósito em minha vida. O meu propósito envolve o cuidar do meu próximo, através das pesquisas. Quantas vidas são salvas graças ao trabalho dos pesquisadores, que dedicam suas vidas para desvendar os mistérios da ciência, iluminam o rumo em direção à cura. Gostaria de agradecer a todos que participaram, que fizeram parte dessa minha linda caminhada pela pesquisa. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto muito obrigada por você ter me dado à chance de fazer iniciação no laboratório, por você ter aberto as portas do laboratório para mim. Obrigada por você ter colocado em minha vida científica a Dra. Rachel Novaes Gomes como orientadora e por ter me orientado durante meu doutorado. Rachel, você é um anjo em minha vida, minha gratidão por você é imensa, obrigada pela orientação. Todo conhecimento que tenho em minha bagagem que levarei por toda minha vida é graças a você. Você foi além de orientadora. Foi amiga. Cada resultado obtido era muito comemorado. E quantas vezes foi você que me estimulou a continuar seguindo em frente. Muito obrigada por tudo. Agradeço ao Dr. Fernando Augusto Bozza, que participou ativamente desse projeto. Muito obrigada por transmitir uma parte de seu imenso conhecimento para mim, conhecimentos que foram fundamentais para o andamento do meu projeto. Gostaria de agradecer também a Dra. Patrícia Bozza por todo carinho e por todo conhecimento que você me transmitiu ao longo da minha vida científica. Gostaria de agradecer ao Dr. Fabrício Pamplona, a Dra. Rosália Mendez-Ottero, ao Dr. Rogério Panizzutti, a Dra. Patrícia Reis, a Dra. Joana C. P. D'Ávila, ao Msc. Matheus Rajao, ao doutorando Gerson Guercio, ao doutorando André Poletto, a Dra. Mariana Godoy e Dra. Louise Moraes por participarem do andamento do meu projeto. Meu sincero agradecimento às Dras. Tatiana Maron, Carolina Moraes, Clarissa Monteiro, Adriana Valocci, Adriana Ribeiro e Cecília Gonçalves. Gostaria de agradecer aos alunos Silvio Caetano Alves Júnior, a Daiane Chaves, a Danielle Albuquerque pelo carinho, amizade e por colaborarem nos meus experimentos. Gostaria de agradecer a doutoranda Flora Magno, por sua amizade e ajuda para o desenvolvimento do meu projeto. Gostaria de agradecer aos meus queridos amigos do laboratório, Isabel Matos, Isaclaudia Gomes de Azevedo, Tatiana Igreja, Mônica e Luciana. Gostaria de dar um agradecimento especial a Rose Branco. Lembro-me até hoje de quando você ligou para minha casa, falando que o Dr. Hugo gostaria de marcar uma entrevista comigo, para fazer iniciação científica. Você foi o anjo que intermediou minha entrada no laboratório de imunofarmacologia e que participou de toda minha jornada científica, sendo uma amiga de verdade. Obrigada a todos do Pavilhão Osório de Almeida, ao laboratório



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

de Investigação Cardiovascular, ao laboratório de Toxinologia e ao laboratório de Inflamação. Gostaria de agradecer aos funcionários do Biotério, em especial ao Nelson e ao pessoal do CECAL, em especial a Thaiz. Gostaria de agradecer também a todos os funcionários do Pavilhão Osório de Almeida, em especial a Tatiane Araújo e Andréia Vieira, ao Alexandre, ao Sr. Antônio, a Priscila, a Dona Rosilda, enfim a todos que se empenham e trabalham em conjunto para o bom funcionamento do departamento, que sempre nos tratam com muito carinho. Muito obrigada aos meus pais, que me deram toda a base para que eu conseguisse conquistar tudo que tenho até hoje, principalmente me ensinando valores e me ensinando o real sentido da palavra companheirismo. Aos meus sogros, muito obrigada por todo amor e carinho. Ao meu marido Ivan Garcia Neto, por todo amor, carinho e companheirismo. Você me ajudou muito, no meu amadurecimento como pessoa que influenciou de forma direta minha vida profissional. Você é o amor da minha vida. Agradeço ao meu tio Heráclio por toda hospitalidade e carinho, se não fosse você eu não estaria na Fiocruz. Você me acolheu em sua casa como se eu fosse sua filha. Minha gratidão por tudo será eterna. Agradeço ao meu irmão João Guilherme e a minha cunhada Fernanda, as minhas cunhadas Juliana Garcia e Giovana Derenzi, aos meus cunhados Vinicius Barroso e Leandro Lessa por todo carinho. Aos meus afilhados João Gabriel, Carlos Eduardo, Pedro Henrique e aos meus sobrinhos, Carolina e João Paulo, por todo amor e por tornarem meus dias mais felizes. Aos meus tios, obrigada por todo carinho, em especial ao meu tio Mário Amarante. Um agradecimento especial à tia Elsa. Pude estar ao seu lado participando da sua luta contra o Alzheimer. Obrigada a Deus, quantas vezes me senti sozinha e sem explicações no desenvolvimento do projeto e recorri a fé e as orações, para conseguir uma luz, um auxílio no entendimento e no direcionamento do projeto de doutorado. A tese é como a vida, onde lutamos com garra para alcançar os objetivos, mas nem sempre os objetivos que temos são os de Deus e por vezes precisamos ser maleáveis e sensíveis para perceber o curso que o projeto quer seguir. Temos vitórias, alegrias, conquistas, mas às vezes obstáculos também, que nos fazem crescer e amadurecer profissionalmente.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Epígrafe

Graças aos grandes pensadores, aos pais da neurociência temos a bagagem e as ferramentas necessárias para embarcar na viagem de desvendar o funcionamento do mais complexo órgão do nosso corpo, o cérebro. Mariana Cunha

“Um cientista no laboratório não é um mero técnico: é uma criança confrontando fenômenos naturais que são tão impressionantes quanto contos de fada”. Marie Currie



LISTA DE ABREVIações

α – Alfa

β – Beta

γ – Gama

μg - Micrograma

ADAM – Desintegrina e Metaloprotease (desintegrin and metalloprotease).

AGE – Produto Final de Glicação Avançada (Advanced Glycation End-product).

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Acquired Immune Deficiency Syndrome).

AMPA - Receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AMP cíclico - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

APOE - Apolipoproteína E

APP – Proteína Precursora do Amilóide (Amyloid Precursor Protein)

CAA – Angiopatia Amiloide Cerebral (Cerebral Amyloid Angiopathy)

BACE – Enzima de Clivagem da Proteína Precursora Amiloide (Beta Amyloid Cleaving Enzyme)

BCA – Ácido Bicinchonínico (Bicinchoninic acid)

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (Brain Derived Neurotrophic Factor)

CaMK – Cálcio calmodulina quinase

CCL – Quimiocina Ligante (Chemokine Ligand)

CCR – Receptor da Quimiocina Ligante

CLP – Ligadura e Perfuração Cecal (Cecal Ligation and Puncture)

C-terminal – região carboxi-terminal

CREB – Ligante do Elemento de Resposta do AMP cíclico (cAMP response element-binding)

CXCL – Quimiocina Ligante - Motivo C-X-C (C-X-C motif ligand)

CXCR – Receptor do CXCL

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindole

dB - Decibel

ERK – Quinase Regulada pelo Sinal Extracelular (Extracellular Signal-Regulated Kinase)



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

GABA – Ácido Gama Aminobutírico

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial (Glial fibrillar Acid Protein)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immune Deficiency Virus)

IBA-1 – Ácido Indolbutírico (Indolbutiric Acid)

IFN - Interferon

IL - Interleucina

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida (Inducible Nitric Oxide Synthase)

IRDye - “Dye” Infravermelho (InfraRed dye)

KC – Quimiocina Derivada de Queratinócito (keratinocyte-derived chemokine)

kDa - Quilodalton

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LPS - Lipopolissacarídeo

LTP – Potenciação de Longo Prazo (Long Term Potenciation)

M1 – Macrófago do tipo 1

M2 – Macrófago do tipo 2

mA - Miliamperes

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (Mitogen-Activated Protein Kinases)

MIF – Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (Macrophage Migration Inhibitory Factor)

MIP – Proteína Inflamatória de Macrófago (Macrophage Inflammatory Protein)

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro (Messenger Ribonucleic Acid)

NF- κ B – Fator Nuclear Kappa B (Nuclear Factor Kappa B)

ng - nanogramas

NK – Células Matadoras Naturais (Natura Killer Cells)

NMDA - N-metil D-Aspartato

NMDAR – Receptor do NMDA

N-terminal – Região amino terminal

PBS – Tampão fosfato salina (Phosphate Buffered Saline)

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

Pen – Intensificador de Prenisilina (Presenilin Enhancer)

p-ERK ou pERK – ERK fosforilada (Phosphorylated ERK)

PI3K – Fosfatidilinositol cinase



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PSD95 – Proteína de Densidade Pós-sináptica 95 (postsynaptic density protein 95)
PPI – Pré-pulso inibidor (Pre-Pulse Inhibitory)
RIPA – Tampão de Radioimunoprecipitação (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer)
RNA – Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)
RNS – Espécies Reativas do Nitrogênio (Reactive Nitrogen Species)
ROS – Espécies Reativas do Oxigênio (Reactive Oxygen Species)
RPM – Rotação Por Minuto
SNC – Sistema Nervoso Central
tau – Proteína Associada ao Microtúbulo (Microtubule Associated Protein)
TNF – Fator de Necrose Tumoral (tumor necrosis factor)
TNF-R - Receptor de TNF
TUNEL – Terminal deoxinucleotidil Transferase (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelin)
XCL1 - Linfotactina



LISTA DE FIGURAS

4. Introdução

Figura 4.1. Microglia na forma ramificada é ativada em resposta a um insulto e libera mediadores inflamatórios que podem levar a morte neuronal.....	3
Figura 4.2. As enzimas responsáveis pela clivagem da APP pertencem a família das α -, β - e γ -secretases	6
Figura 4.3. Microglia na forma ramificada e na forma ameboide.....	11
Figura 4.4. O CCR2 ativa a via da ERK em neurônios, astrócitos e microglia.....	17

6. Materiais e métodos

Figura 6.1. Caixa d'água utilizada no experimento de natação forçada.....	22
Figura 6.2. Caixa utilizada no ensaio de esquiva inibitória.....	23

7. Resultados e discussão

Figura 7.1. Atividade motora dos animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 no ensaio de campo aberto.....	30
Figura 7.2. Velocidade de natação dos animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 durante a natação forçada.....	31
Figura 7.3. Atividade reflexa dos animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 em resposta ao estímulo auditivo	33
Figura 7.4. Curva de aprendizado dos animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 na natação forçada	35
Figura 7.5. Curva de aprendizado dos animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 com 5 semanas de idade na esquiva inibitória.....	37
Figura 7.6. Curva de aprendizado dos animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 com 10 semanas de idade na esquiva inibitória.....	38
Figura 7.7. Tempo de latência a plataforma dos animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 na esquiva inibitória.....	40
Figura 7.8. Expressão de ERK fosforilada no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 uma hora após um treino na esquiva passiva	44
Figura 7.9. Expressão de BDNF no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6, 12 horas após o treino na esquiva passiva	45
Figura 7.10. Expressão de sinaptofisina e PSD95 no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6.....	46
Figura 7.11. Expressão e co-localização entre PSD95 e sinaptofisina no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6	47



Figura 7.12. Expressão de proteína amiloide β no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} (B) e C57BL6 (A) com 10 semanas de idade	51
Figura 7.13. Expressão de proteína amiloide β no córtex cerebral dos animais CCR2 ^{-/-} (B) e C57BL6 (A) com 10 semanas de idade	52
Figura 7.14. Expressão de IBA-1 (micróglia) no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} (C) e C57BL6 (A)	53
Figura 7.15. Expressão de IBA-1 (micróglia) no cortex de animais CCR2 ^{-/-} (C) e C57BL6 (A)	54
Figura 7.16. Nível de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-10) e quimiocinas (CCL2 e IL-10) no cérebro total e no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 com 10 semanas de idade.....	55
Figura 7.17. Expressão de pro-caspase-1 e da caspase-1 clivada no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6	56
Figura 7.18. Expressão de pro-caspase-12 e da caspase-12 clivada no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6	57
Figura 7.19. Expressão de pro-caspase-3 e da caspase-3 clivada no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6	58
Figura 7.20. Nível de glutamato e glutamina no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 com 10 semanas de idade	60
Figura 7.21. Curva de aprendizado dos animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 idosos na natação forçada.....	63
Figura 7.22. Tempo de Latência a plataforma dos animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 idosos na esquiiva passiva	64
Figura 7.23. Curva de aprendizado dos animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6 idosos na esquiiva inibitória.....	65
Figura 7.24. Expressão de proteína amiloide β no córtex cerebral de animais CCR2 ^{-/-} (C) e C57BL6 (A) idosos.....	66
Figura 7.25. Expressão de proteína amiloide β no hipocampo de animais CCR2 ^{-/-} (C) e C57BL6 (A) idosos.	67
Figura 7.26. Perfusão cerebral do animais CCR2 ^{-/-} e C57BL6	69



Sumario

1. Preliminares	i
Folha de rosto	ii
Ficha catalográfica	iii
Folha de aprovação	iv
Folha de dedicatória	v
Folha de agradecimentos	vi
Folha de epígrafe	viii
Lista de abreviações	ix
Lista de figuras	x
2. Resumo	xi
3. Abstract	xii
4. Introdução	1
4.1. Neuroinflamação e doenças neurodegenerativas	1
4.1.1. Demências: Alzheimer como protótipo de doença neurodegenerativa	4
4.1.1.1. Mecanismos do processo neuroinflamatório: A proteína amiloide β	4
4.1.1.2. Mecanismos da neuroinflamação: As células da glia	9
4.1.1.3. Quimiocinas liberadas durante a neuroinflamação	11
4.1.1.3.1. A quimiocina ligante do tipo 2, o CCL2	13
5. Objetivo geral e objetivos específicos	19
6. Materiais e métodos	20
6.1. Animais	20
6.2. Avaliação da memória contextual através do Morris Water Maze	21
6.3. Esquiva passiva	23
6.4. “ <i>Single Trial</i> ” – Esquiva de um treino	23
6.5. “ <i>Multiple Trial</i> ” – Esquiva de múltiplos treinos	23
6.6. Ensaio de campo aberto e teste de inibição de pré-pulso (PPI)	24
6.7. Western blotting	24



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

6.8. Imunohistoquímica.....	25
6.7. Análises da microcirculação cerebral por microscopia intravital.....	25
6.8. Avaliação da densidade capilar funcional.....	26
6.9. Avaliação da interação leucócito-endotélio.....	26
6.10. Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral por Laser Speckle.....	26
6.9. Análise estatística	27
7. Resultados e Discussão.....	28
8. Considerações finais.....	70
9. Referências Bibliográficas.....	71
ANEXO I.....	80
ANEXO II.....	82
ANEXO III.....	84
ANEXO IV.....	100
ANEXO V.....	107
ANEXO VI.....	117



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PAPEL DO CCR2 NO APRENDIZADO E NO PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Mariana Gisely Amarante Teixeira da Cunha

Introdução: O CCR2 é o receptor do CCL2/MCP-1. O CCR2 é expresso em monócitos, células endoteliais, neutrófilos ativados, micróglia e astrócitos. Recentemente, alguns estudos mostram a expressão constitutiva do CCR2 e do CCL2 em regiões do sistema nervoso central, como o hipocampo. Como o hipocampo está envolvido com a consolidação de memória, nós analisamos o papel do CCR2 no processo de aprendizado e consolidação de memória. **Métodos:** Animais geneticamente deficientes para o CCR2 e animais controle foram submetidos a esquivas passiva e a natação forçada, para examinar a memória aversiva e a memória contextual. A resposta motora foi avaliada pelo ensaio de campo aberto, e o reflexo pelo teste de inibição de pré-pulso. Os animais foram submetidos a esquivas passivas de múltiplos treinos para analisar a curva de aprendizado e o esquecimento da memória. O próximo passo foi verificar a expressão de importantes mediadores envolvidos com a consolidação de memória por western blotting, como a ERK fosforilada e BDNF. E o último passo foi verificar se a deficiência do CCR2 afeta a sinapse no hipocampo, pela expressão e co-localização de PSD95 e sinaptofisina por imunohistoquímica e a expressão de sinaptofisina e PSD95 por western blotting. **Resultados:** A ausência do CCR2, impediu a consolidação de memória aversiva e a memória contextual. O animal deficiente para o CCR2 requer mais treinos para aprender na esquivas passiva e a memória decai de forma mais rápida, quando comparado com o grupo controle. A expressão de ERK fosforilada está reduzida 1 hora após um treino na esquivas passiva no hipocampo de animais deficientes para o CCR2 assim como a expressão de BDNF maduro está reduzida 12 horas após um treino na esquivas passiva. Nós observamos que a deficiência do CCR2 afeta a sinapse, com importante redução da co-localização entre sinaptofisina e PSD95 no hipocampo e redução na expressão de sinaptofisina no hipocampo. Os animais CCR2^{-/-} tem aumento da expressão da proteína amiloide beta no hipocampo e no córtex cerebral ao redor dos vasos sanguíneos, associado com redução da perfusão sanguínea no cérebro, redução da expressão de caspases-3 e -12, sem diferença na expressão de IBA-1 e nos níveis de citocinas e quimiocinas no cérebro. **Conclusão:** A ausência do CCR2 altera a estrutura das sinapses, reduzindo a expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina e PSD95, bem como leva ao acúmulo de proteína amiloide beta no tecido cerebral, culminando com a disfunção cognitiva.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PAPEL DO CCR2 NO APRENDIZADO E NO PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIA

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Mariana Gisely Amarante Teixeira da Cunha

Background: CCR2 is the receptor for CCL2/MCP-1. CCR2 is expressed in monocytes, endothelial cells, activated neutrophils, microglial cells and astrocytes. Some studies show the constitutive expression of CCR2 and CCL2/MCP-1 in specific areas of the central nervous system, such as the hippocampus. Because the hippocampus is important for memory consolidation, we studied the role of CCR2 in learning process and in memory consolidation. **Methods:** CCR2 deficient mice and wild type were submitted to passive avoidance test and to water maze test, to evaluate aversive memory and contextual memory, respectively. The motor response was evaluated by open field test, while the reflex was evaluated by pre-pulse inhibitory response. The animals were submitted to passive avoidance test of multiple trials, to analyze the learning curve and the retrieval of memory. The next step was to verify the expression of proteins involved with memory consolidation, such as the phosphorylated ERK and mature BDNF by western blotting,. And the last step was to verify if the CCR2 deficiency affect the synapsis in hippocampus, by the expression and co-localization of PSD95 and synaptophysin using immunohistochemistry and the expression of synaptophysin and PSD95 by western blotting. **Results:** The absence of CCR2, impaired consolidation of aversive and contextual memories. The CCR2 deficient mice required more trials to learn in passive avoidance test and the memory decay was faster, when compared to the wild type group. The expression of phosphorylated ERK is decreased 1 hour after one trial in passive avoidance test in the hippocampus of CCR2 deficient mice as was the expression of mature BDNF 12 hours after one trial in passive avoidance test. We observed that the deficiency of CCR2 affects the synapsis, with an important decrease in co-localization of PSD95 and synaptophysin in the hippocampus and decreased expression of synaptophysin in the hippocampus of CCR2 deficient mice. CCR2^{-/-} animal had increased expression of beta amyloid protein around the blood vessels in the hippocampus and in the cortex, associated with decreased brain perfusion, increased expression of caspase-12 and caspase-3, but no difference in the expression of IBA-1 and in cytokines and chemokines levels. **Conclusions:** Absence of CCR2 changes the structure of synapsis, decreasing the pre-synaptic protein synaptophysin in hippocampus and also lead to accumulation of beta amyloid protein in brain tissue, culminating with cognitive dysfunction.



4. Introdução

No presente estudo investigamos a consequência da ausência do receptor da quimiocina CCL2, o CCR2, no processo de aprendizado e consolidação de memória contextual e aversiva em camundongos. O CCR2 é expresso de forma constitutiva em regiões importantes do sistema nervoso central, como por exemplo no hipocampo, envolvidas com a consolidação da memória. O CCR2 é ativado pelo CCL2 que também é expressa de forma constitutiva no sistema nervoso central (Banisadr e cols., 2005a). Poucos trabalhos na literatura descrevem o papel fisiológico do CCR2 no sistema nervoso central e focam apenas no seu papel neuroinflamatório. Nossos resultados demonstram que o CCR2 tem um papel importante não só na resposta inflamatória, mas também na fisiologia do aprendizado e da consolidação de memória.

4.1. Neuroinflamação e doenças neurodegenerativas

A neuroinflamação é uma resposta de células do sistema nervoso central a um insulto que pode levar à remoção do agente agressor, a cicatrização e o reparo tecidual, sendo marcada pela ativação dos neurônios, células da glia e células endoteliais que sintetizam e liberam mediadores inflamatórios (Frank-Cannon e cols., 2009). Esse insulto pode decorrer de um trauma, pelo acúmulo de algumas proteínas (como a proteína amiloide β) no cérebro, infecção, isquemia ou hipóxia ou neurotoxinas como pode ser observado na figura 4.1 (Frank-Cannon e cols., 2009; Shastri e cols., 2013).

A neuroinflamação aguda envolve principalmente a ativação da micróglia e dos astrócitos imediatamente após o insulto. A migração de leucócitos da circulação para o cérebro ocorre em regiões específicas do sistema nervoso central, quando não há quebra da barreira hematoencefálica, como o fluido cérebro-espinhal, meninges e parênquima cerebral (Wilson e cols., 2010). Na neuroinflamação aguda ocorre a liberação de citocinas e quimiocinas, bem como há aumento do estresse oxidativo e nitrosativo. No entanto, dependendo da



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

magnitude da resposta inflamatória, a neuroinflamação aguda pode ser contida rapidamente e não levar a grandes prejuízos neuronais (Tansey e cols., 2007).

A neuroinflamação crônica ocorre devido à persistência de um insulto, causando ativação sustentada da micróglia, liberação de mediadores inflamatórios e aumento significativo e persistente do estresse oxidativo e nitrosativo. Essa inflamação sustentada pode levar ao dano e morte neuronal (Figura 4.1), disfunção da barreira hematoencefálica, com a migração de leucócitos da corrente sanguínea para o SNC (Rivest, 2009; Tansey e cols., 2007).

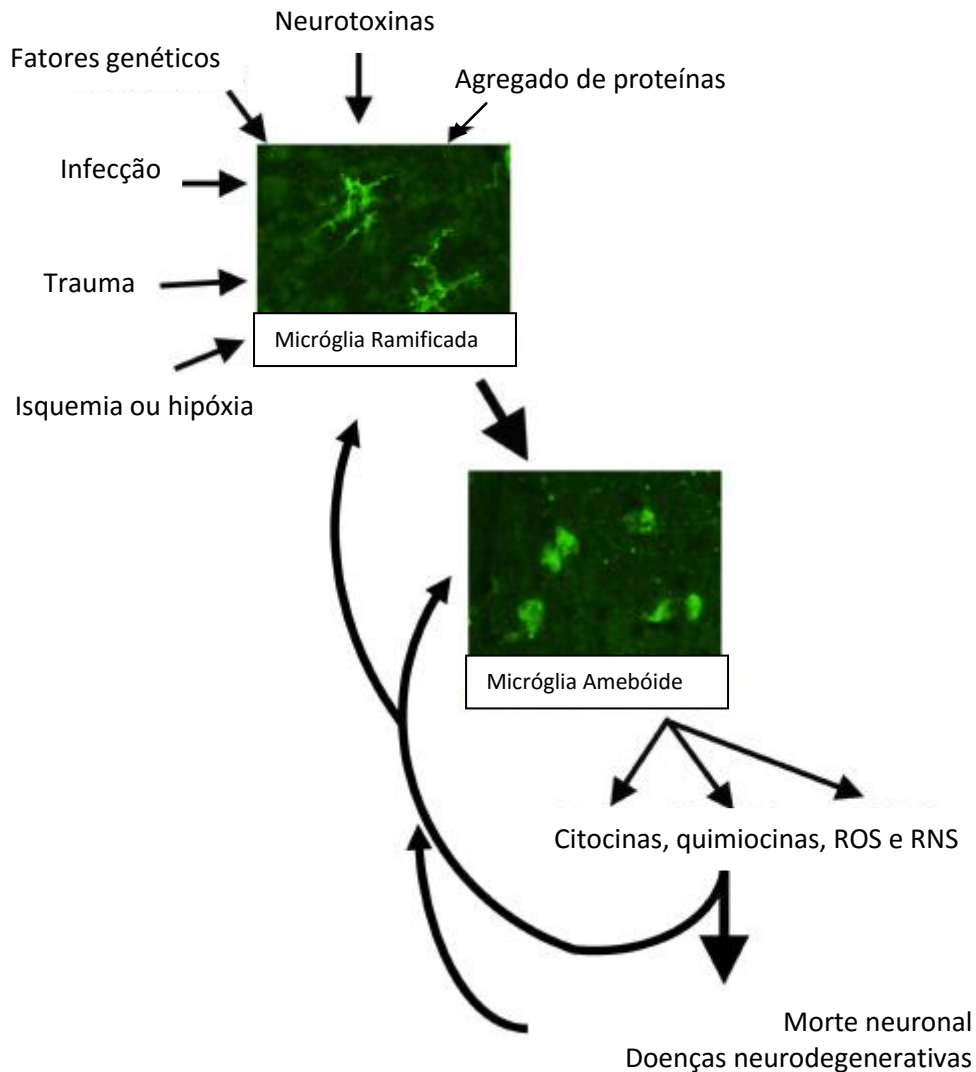


Figura 4.1. Microglia na forma ramificada é ativada em resposta a um insulto e libera mediadores inflamatórios que podem levar a morte neuronal. A micróglia inativa, na forma ramificada, é ativada, adquirindo a forma amebóide, em resposta a um insulto: neurotoxinas, acúmulo de proteínas, trauma, infecção, isquemia ou hipóxia. Quando ativada, a micróglia libera citocinas, quimiocinas, ROS (espécies reativas do oxigênio) e RNS (espécies reativas do nitrogênio). Fonte: Frank-Cannon e cols. (2009).



Algumas doenças neurodegenerativas cursam com neuroinflamação crônica, entre estas podemos destacar a doença de Alzheimer (Hensley, 2010), a síndrome de Parkinson (Hirsch, 2012), a esclerose múltipla (Nataf, 2009), doença de Huntington (Moller, 2010), a esclerose lateral amiotrófica (Lewis e cols., 2012), bem como, a degeneração macular associada à idade (Buschini e cols., 2011). Dependendo da magnitude dos processos inflamatórios, a perda de função ou morte neuronal pode ocorrer de forma rápida e intensa, levando a perda cognitiva permanente e progressiva.

4.1.1. Demências: Doença de Alzheimer como protótipo de doença neurodegenerativa

A doença de Alzheimer foi descrita pela primeira vez por Alois Alzheimer, em 1907. O Alzheimer é uma doença neurológica progressiva que afeta cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. No Alzheimer ocorre declínio cognitivo progressivo, evoluindo para perda da atividade motora e da capacidade cognitiva, onde o paciente fica totalmente restrito ao leito. O prognóstico da doença é extremamente desfavorável e o tempo médio em que o paciente evolui a óbito é de cerca de 9 anos após o diagnóstico. No Alzheimer ocorre acúmulo da proteína amiloide β , principalmente a proteína amiloide β p42 (Citron, 2002).

4.1.1.1. Mecanismos do processo neuroinflamatório: A proteína amiloide β

A proteína amiloide β é proveniente da clivagem da proteína precursora amiloide (APP). A clivagem da APP é realizada pelas enzimas γ -, α - e β -secretases. As enzimas com atividade α -secretase são ADAM9, ADAM10 e ADAM17. Um exemplo de β -secretase seria BACE-1. Já as γ -secretases compreendem as prenilinas 1 e 2. A clivagem da APP pela ação das secretases está ilustrada na figura 4.2. Existem duas vias de clivagem da APP, a não-amiloidogênica e a amiloidogênica. Na via não-amiloidogênica, a APP sofre ação das α -secretases, liberando APP alfa solúvel e o fragmento C83 permanece na



membrana plasmática. Na via amiloidogênica ocorre a formação da proteína amiloide β . A enzima BACE1 age sobre a APP presente na membrana, liberando o fragmento solúvel APP β e o fragmento C99 permanece na membrana. As enzimas γ -secretases agem no fragmento C99, liberando a proteína amiloide β . A proteína amiloide β contém 40 resíduos, mas existe uma variação com a produção da proteína amiloide β com 42 resíduos, que é predominante nas placas de amiloide no cérebro (Allinson e cols., 2003; LaFerla e cols., 2007; Steiner e cols., 2002; Vassar e cols., 1999; Wolfe e cols., 1999).

A proteína amiloide β pode ser arranjada de diversas formas, formando monômeros, oligômeros, protofibrilas e fibrilas, como podemos observar na figura 4.2. Dados na literatura demonstram que a proteína amiloide β em forma de monômero não tem efeito tóxico sobre os neurônios. No entanto, as formas oligoméricas e de fibrilas são altamente tóxicas e induzem a alteração no LTP no hipocampo (LaFerla e cols., 2007)

Além de ser liberada, a proteína amiloide β , pode ser internalizada nos neurônios. Quando internalizada, a proteína amiloide na forma monomérica pode se arranjar na forma de oligômero induzindo disfunção neuronal, com inibição da atividade mitocondrial e do proteassoma, levando a um aumento da mobilização de cálcio intracelular e hiperfosforilação de tau (LaFerla e cols., 2007).

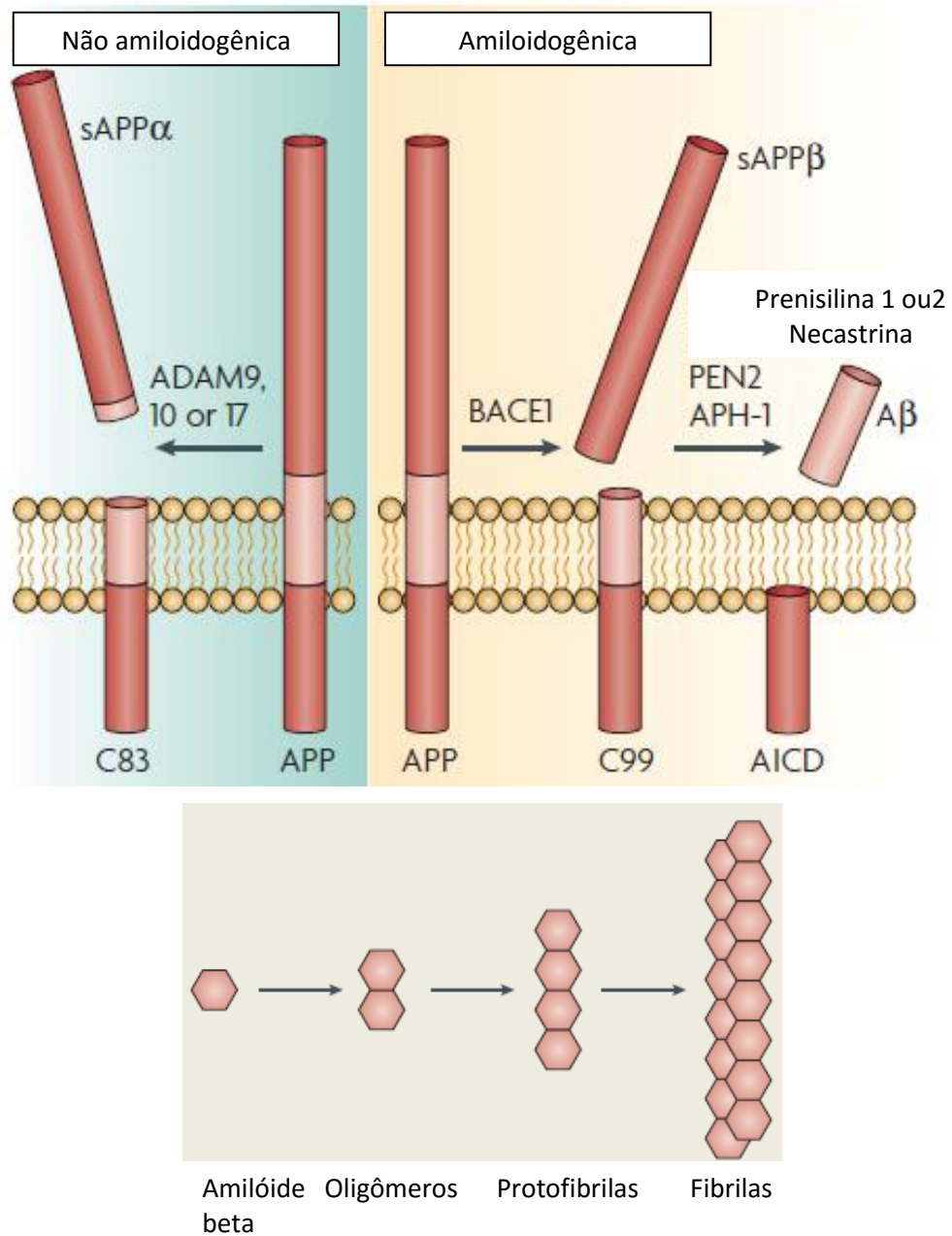


Figura 4.2. As enzimas responsáveis pela clivagem da APP pertencem a família das α -, β - e γ -secretases. (A) As proteínas ADAM9, 10 e 17 pertencem a família das α -secretases. A proteína BACE1 pertence a família da β -secretases. As proteínas prenilinas 1 e 2 pertencem a família das γ -secretases. (B) A proteína amiloide β poderá se arranjar de forma monomérica, oligomérica, sob forma de protofibrilas e fibrilas. Fonte: (LaFerla e cols., 2007).



- A microcirculação

No tecido cerebral, as artérias piais correm pelo espaço subaracnóide, e dão origem às artérias intracerebrais, que penetram no parênquima cerebral. As artérias intracerebrais são separadas do parênquima cerebral por uma camada unicelular semelhante aos fibroblastos da pia mater e pela membrana de glia derivada de astrócitos. Essas artérias intracerebrais se ramificam em artérias menores que por sua vez se ramificam em arteríolas, que perdem apoio dos limitantes gliais e dão origem às arteríolas pré-capilares e capilares do cérebro (Zlokovic, 2011). Alguns estudos mostram a existência de um comprometimento vascular cerebral em doenças neurodegenerativas (Iadecola, 2004).

Além do acúmulo intracelular e extracelular de amiloide em neurônios, no Alzheimer pode ocorrer acúmulo da proteína amiloide β ao redor dos vasos, levando ao quadro de angiopatia cerebral amiloideana (CAA). Esse acúmulo ocorre preferencialmente nas artérias presentes da leptomeninge e no córtex (Kulic e cols., 2012). Esse acúmulo da amiloide ao redor dos vasos leva a uma resposta inflamatória que pode ter como consequências a demência e a hemorragia. Existem três hipóteses sobre as causas da CAA:

1. A hipótese da drenagem da proteína amiloide β : Onde a causa do acúmulo da proteína amiloide β ao redor dos vasos é decorrente de um déficit na drenagem da proteína amiloide β na região perivascular (Bahmanyar e cols., 1987).
2. A hipótese sistêmica, onde o receptor transportador de proteína amiloide sistêmico atravessa a barreira hematoencefálica, resultando em depósito de proteína amiloide β . Os receptores que parecem estar envolvidos com o transporte da proteína amiloide β para os vasos são: AGE (que vem do inglês "Advanced Glycation End-product"), o transportador de LDL (Lipoproteína de baixa densidade), e os receptores scavenger (Bahmanyar e cols., 1987).
3. A hipótese da parede vascular, onde ocorre a produção da proteína amiloide pelas células da musculatura lisa presentes na túnica média de artérias



cerebrais. Artérias mais calibrosas, que contém mais musculatura lisa, contém mais depósito de proteína amiloide β , do que artérias de pequeno calibre (Frackowiak e cols., 1994).

As hemorragias observadas na CAA podem ocorrer de forma isolada ou podem ser multifocais e recorrentes. Na hemorragia correlacionada com a CAA pode ocorrer a formação de um edema ao redor do hematoma e ocorre também a presença de necrose com aumento do infiltrado de células inflamatórias. A segunda cascata de injúria envolve o edema vasogênico decorrente da quebra da barreira hematoencefálica, com disfunção mitocondrial (Inaji e cols., 2003; Mehndiratta e cols., 2012).

A proteína amiloide β também desencadeia uma neuroinflamação, ativando a micróglia e astrócitos que além de romper a barreira hematoencefálica, leva a um aumento do infiltrado celular no cérebro. A ação da proteína amiloide β na micróglia induz a liberação de TNF- α e aumenta a liberação de glutamato, que se liga ao receptor NMDA, que ao ser excitado em demasia, leva a morte neuronal (Floden e cols., 2005).

Existem dados na literatura que demonstram que a proteína amiloide beta teria um papel importante no comprometimento da microcirculação, no entanto alguns estudos demonstram que o comprometimento da microcirculação parece ter relação com o desenvolvimento do Alzheimer ou do dano cognitivo. Estudos sugerem que portadores de doenças que comprometem a microcirculação parecem ter maior propensão a desenvolver o dano cognitivo e Alzheimer, como: a hipertensão (Launer and Hofman, 2000), esclerose múltipla (Hoffmann e cols., 2007), 1997), Acidente Vascular Cerebral (Sun e cols., 2014), Doença arterial coronariana ((Vidal e cols., 2010) e diabetes (Ott e cols., 1999). Tucsek e cols. observaram a correlação entre a obesidade, o declínio cognitivo e o comprometimento da microcirculação cerebral (Tucsek e cols., 2014).



4.1.1.2. Mecanismos da neuroinflamação: As Células da glia

O termo glia vem do grego e significa cola. Recebeu essa denominação por pesquisadores que acreditavam que a glia desempenhava apenas um papel de sustentação e de agregação dos neurônios (Lent, 2004).

As células gliais são células não neuronais, que tem a função de defesa, estrutural, participam do metabolismo neuronal, auxiliam no desenvolvimento do sistema nervoso central e regulam a transmissão sináptica. No sistema nervoso temos duas classes de glia: a macroglia e a micróglia. A macroglia que engloba os astrócitos, os oligodendrócitos e as células NG2. Os astrócitos possuem prolongamentos numerosos que emergem do soma e se ramificam profusamente, envolvendo as sinapses, os nodos de Ranvier, envolvendo os capilares sanguíneos cerebrais, revestindo a porção interna das cavidades intracerebrais e das meninges. Os astrócitos expressam uma proteína exclusiva, a proteína ácida fibrilar glial, conhecida como GFAP (Lent, 2004).

Outro tipo celular presente no sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal) é a micróglia, onde existem dois tipos de micróglia, conforme foi classicamente descrito por (Del Rio-Hortega, 1919). Micróglia ramificada, que são quiescentes e a micróglia ameboide, que têm atividade fagocítica e realiza a apresentação de antígeno (Figura 4.3) (Lent, 2004). Dados recentes da literatura demonstram que a forma ramificada da micróglia não é quiescente e possui papel na neurogênese, na neuroproteção e no controle do arranjo das sinapses, removendo sinapses posicionadas em locais inapropriados (Paolicelli e cols., 2011; Sierra e cols., 2010; Vinet e cols., 2012). A micróglia ramificada inicialmente classificada como quiescente é altamente dinâmica no parênquima cerebral. Atua promovendo a constante vigilância do tecido ao realizar pinocitose de amostras do parênquima cerebral para avaliar a homeostase do tecido (Nimmerjahn e cols., 2005). Quando a micróglia detecta a presença de algum agente ou de moléculas que possam ser danosas para o tecido cerebral, os receptores de reconhecimento de padrão expressos em sua superfície são ativados e induzem a transcrição, tradução e liberação de uma gama de mediadores inflamatórios, bem como a alteração de sua morfologia de uma forma ramificada, para a forma ameboide



como pode ser observado na figura 4.3 (Frank-Cannon e cols., 2009). Na verdade, o termo ativação é um resumo de diferentes estados de ativação da micróglia. Até agora, está descrito na literatura, que a micróglia pode apresentar dois perfis de ativação: um perfil pró-inflamatório, com aumento da síntese de citocinas inflamatórias e de espécies reativas do oxigênio; ou um perfil anti-inflamatório, com produção de mediadores anti-inflamatórios, que tem um papel importante no reparo tecidual e na remoção de debris celulares (Gordon, 2003).

A micróglia pode ser ativada em virtude de um trauma, uma infecção, um quadro de isquemia, bem como durante o curso de doenças neurodegenerativas (Figura 4.3). A micróglia ativada realiza a fagocitose de debris celulares, de células mortas, ou de micro-organismos, além de produzir mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas e citocinas como CCL3, CCL4, CCL2, IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Kettenmann e cols., 2011; Smith e cols., 2012; Wood, 2003). As citocinas produzidas serão responsáveis pela polarização da micróglia, num estado ativado, denominado "M1" ou num estado alternativamente ativado, denominado "M2". O IFN- γ tem sido associado com a polarização "M1" e a IL-4 com a polarização "M2". A micróglia com perfil "M1" é caracterizada pela alta expressão de IL-12 e baixa expressão de IL-10 e alta produção de espécies reativas do oxigênio, enquanto que a micróglia com perfil "M2" expressa altos níveis de IL-10, de arginase e do receptor de manose (MacMicking e cols., 1997; Mantovani e cols., 2004). A Arginase é importante para a produção de poliaminas, prolina e ornitina, que contribuem para o processo de cicatrização e reparo tecidual. Além disso, a arginase compete com a iNOS pela arginina, reduzindo a produção do óxido nítrico (Corraliza e cols., 1995; Morris, 2007; Munder, 2009). No Alzheimer a micróglia tem um papel importante na fagocitose e degradação da proteína amiloide β , de forma dependente de sua polarização. Dados na literatura demonstram que a micróglia do tipo "M1", tem menor poder fagocítico sobre a proteína amiloide β . Já a micróglia alternativamente ativada, com perfil "M2", tem uma alta capacidade fagocítica (Koenigsknecht-Talboo and Landreth, 2005).

A IL-1 β e o TNF- α induzem a neurotoxicidade via produção elevada de glutamato, além de induzir a morte do oligodendrócito (Abend e cols., 2013; Takahashi e cols., 2003). No Parkinson a IL-1 β aumenta a síntese de IFN- γ e



TNF- α e promove a degeneração de neurônios dopaminérgicos (Koprich e cols., 2008). Já a IL-6 foi considerada por um longo tempo como biomarcador de severidade da sepse, onde seus níveis estavam elevados em cerca de 60 a 100% dos pacientes com sepse (Gogos e cols., 2000).

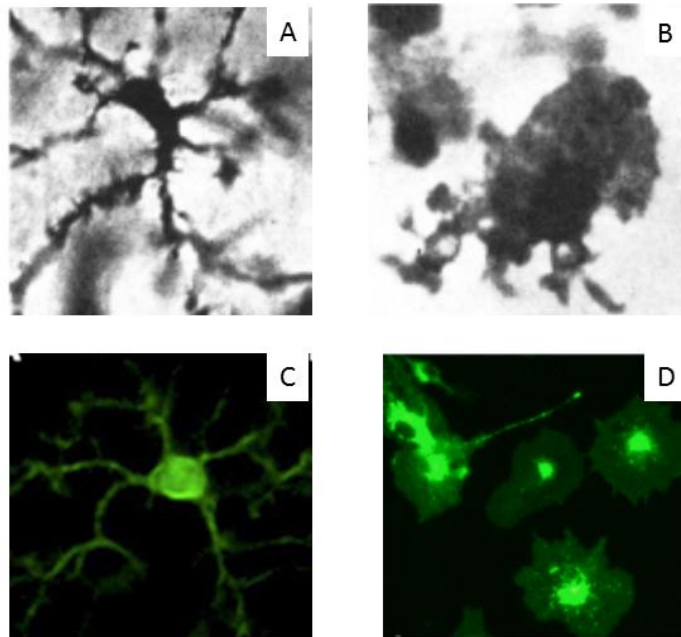


Figura 4.3. Microglia na forma ramificada e na forma ameboide. Nas figuras A e C podemos observar a micróglia na forma ramificada e nas figuras B e D a forma ameboide da micróglia. As figuras A e B foram obtidas por Del Rio-Hortega, o cientista que descobriu a micróglia. Na figura C foi realizada uma imunohistoquímica da micróglia que foi marcada com anticorpo anti-IBA1. Na figura D foi realizada uma imunohistoquímica da micróglia após o estímulo com LPS. A micróglia foi marcada com anticorpo anti-ILB4. Fonte: Kettenmann e cols. (2011); Penfield (1932) e Thored e cols. (2009).

4.1.1.3. Quimiocinas liberadas durante a neuroinflamação

As quimiocinas são proteínas liberadas por leucócitos, células endoteliais, células residentes de alguns tecidos (como neurônios), que induzem a migração de leucócitos para o sítio da inflamação, bem como promovem a ativação dessas células (Janeway, 2005). De acordo com a União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR – The International Union of Basic and Clinical



Pharmacology) , as quimiocinas são classificadas de acordo com a posição dos resíduos de cisteína em:

- C quimiocinas: contém apenas um resíduo cisteína próxima a região aminoterminal;
- CC quimiocinas: contém dois resíduos de cisteína adjacentes próximos a região aminoterminal;
- CXC quimiocinas: possui um aminoácido qualquer entre os resíduos de cisteína;
- CX₃C quimiocina: contém 3 aminoácidos entre os resíduos de cisteína.

Como exemplo de C quimiocina nós temos a linfotactina (conhecida como XCL1), que se liga ao CXCR1 e é liberada por células TCD4 e TCD8, e promove a atração de tímócitos, células dendríticas, células NK (I. Estudos demonstram que essa quimiocina também é liberada por macrófagos, pela micróglia e por astrócitos, e tem um papel importante na neuroAIDS, aumentando migração de linfócitos T para o sistema nervoso central. A proteína viral tat é capaz de induzir o aumento da liberação de XCL1(Kim e cols., 2004).

Na família das CXC quimiocinas temos o CXCL8 (IL-8), o CXCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL10 e CXCL13. O CXCL8 é produzido por monócitos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. Tem como receptores o CXCR1 e o CXCR2 e atrai neutrófilo e células T virgens de acordo com a União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR – The International Union of Basic and Clinical Pharmacology). O CXCL8 está aumentado durante a infecção pelo HIV no tecido cerebral e tem sua expressão elevada em astrócitos. O CXCL8 aumenta a replicação do vírus do HIV no tecido cerebral (Mamik and Ghorpade, 2014). De acordo com Ashutosh e cols. (2011) o CXCL8 também se encontra aumentado no cérebro de indivíduos com Alzheimer, sendo liberado por neurônios, pela micróglia e por astrócitos. No entanto, o CXCL8 tem um papel protetor, reduzindo a apoptose neuronal induzida pela proteína amiloide β (cultura de neurônio de feto humano).

No grupo das CC quimiocinas temos o CCL3 (MIP-1 α), CCL4, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CCL11 (eotaxina) e CCL18 (DC-CK). O CCL3 é sintetizado



por monócitos, células T, mastócitos e fibroblastos sendo um potente quimiotático para micróglia. Um estudo realizado por Cudaback e cols. (2015), a APOE (apolipoproteína E, que está envolvido com a homeostase do colesterol), aumenta a secreção de CCL3 pelos astrócitos, com alteração genética que favorece o aumento da expressão de APOE, tornando os indivíduos são mais predispostos ao desenvolvimento do Alzheimer.

O CCL4 é sintetizado por monócitos, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. Tanto o CCL3 quanto o CCL4 tem como receptores o CCR1, 3 e 5 e induzem a atração de monócitos, células T e NK e células dendríticas. O CCL5 é liberado por células T, células endoteliais e plaquetas e induz a atração de monócitos, células T, células NK, basófilos, eosinófilos e células dendríticas via ligação com os receptores CCR1, 3 e 5 de acordo com a União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR – The International Union of Basic and Clinical Pharmacology).

Tanto o CCL3, quanto o CCL4 e CCL5 se ligam ao CCR5. Louboutin and Strayer (2013) demonstraram que o CCR5 tem um papel pró-inflamatório do SNC, aumentando a ativação e a proliferação da micróglia, levando a neuroinflamação e a morte neuronal.

4.1.1.3.1. A quimiocina ligante do tipo 2, O CCL2

O CCL2 pertence à família das CC quimiocinas, com dois resíduos de cisteínas adjacentes. Seu peso molecular é de 13 kDa e sua cadeia é composta por 76 aminoácidos. Ele pode ser expresso de forma constitutiva ou em resposta a processos inflamatórios e/ou infecciosos. As células que sintetizam e liberam o CCL2 são monócitos, células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais, microglia, neurônios, em resposta a estímulos como citocinas, fatores de crescimento, estresse oxidativo e em resposta ao reconhecimento de antígenos presentes nos microorganismos. O CCL2 age ao se ligar ao seu receptor, o CCR2. Uma vez ativado, o CCR2 induz uma cascata de sinalização intracelular (Banisadr e cols., 2005a; Banisadr e cols., 2005b; Yamasaki e cols., 2011).



O CCL2 pode induzir desde a ativação de leucócitos até o aumento da mobilização de cálcio dentro do neurônio e a liberação de neurotransmissores como a dopamina (Banisadr e cols., 2005a; Banisadr e cols., 2005b; Yamasaki e cols., 2011). A sua ação dependerá da célula que será estimulada. O CCL2 aumenta a quimiotaxia de monócitos para o tecido. Quando migram para os tecidos, os monócitos se transformam em macrófagos. Os macrófagos estão envolvidos tanto com a fagocitose de microorganismos, quanto com a apresentação de antígenos às células T (Yamasaki e cols., 2011). O CCL2 também parece ter um papel importante na indução da migração de neutrófilos ativados com LPS para os tecidos durante a sepse e esse aumento do infiltrado de neutrófilos está associado com uma maior produção de radicais livres e a disfunção orgânica (Souto e cols., 2011).

No modelo de endotoxemia induzida pela injeção de LPS, foi observado um aumento significativo dos níveis de CCL2 no cérebro de camundongos e houve uma superexpressão de CCR2 tanto na microglia quanto em monócitos desses camundongos 24 horas após o desafio (Cazareth e cols., 2014). A ausência do CCL2 reduziu a neuroinflamação observada após a injeção de LPS, acompanhada de menor da migração de microglia tanto no córtex quanto no hipocampo 6 horas após o desafio. E essa redução da migração da microglia foi associada com redução dos níveis das quimiocinas CCL3, CCL4, MIP-1 γ , MCP-3 e eotaxina (Thompson e cols., 2008).

Dados da literatura também suportam a participação do CCL2/CCR2 na fisiopatologia de doenças que afetam o sistema nervoso central como isquemia cerebral (Kim e cols., 1995; Wang e cols., 1995), encefalomielite autoimune experimental (Ransohoff e cols., 1993), esclerose múltipla (McManus e cols., 1998), Alzheimer (Ishizuka e cols., 1997) e traumatismo craniano (Semple e cols., 2010).

O grupo de Kim e cols. (1995) observou que camundongos que tiveram a artéria cerebral média ocluída, apresentaram um pico de expressão de MCP-1 no tempo de 48 horas após o insulto. O estudo de Wang e cols. (1995) demonstraram que os animais com oclusão da artéria cerebral média, apresentam aumento significativo da expressão do RNA mensageiro (mRNA) de CCL2 no



córtex após 6 horas, 12 horas e 48 horas permanecendo este aumento por até 5 dias. Nesse estudo o autor sugere que o CCL2 pode ter um papel na resposta inflamatória crônica que ocorre após a isquemia cerebral.

O CCL2 tem um papel importante também na encefalomielite autoimune, sendo responsável pela atração e acúmulo de mononucleares no sistema nervoso central. E os astrócitos são os principais produtores de CCL2 (Ransohoff e cols., 1993). Na esclerose múltipla também há aumento da expressão de CCL2, que ocorre principalmente no centro da lesão, sendo mais presente em lesões agudas do que crônicas. E os autores sugerem que o CCL2 possa ter um papel importante no desenvolvimento de lesões no SNC na esclerose múltipla (McManus e cols., 1998).

No traumatismo craniano o CCL2 participa da neuroinflamação, aumentando a migração de macrófagos. Pacientes com traumatismo craniano possuem aumento dos níveis de CCL2 no fluido cerebroespinal, até 10 dias após o trauma, sendo o pico nos tempos de 24 e 48 horas. Em camundongos, o pico dos níveis de CCL2 ocorreu nos tempos de 4 e 12 horas após o trauma. Para estudar o papel do CCL2 na neuroinflamação que ocorre após o traumatismo craniano, os autores utilizaram animais geneticamente deficientes para o CCL2. A ausência do CCL2 impactou na redução do volume da lesão cerebral, da perda neuronal, do acúmulo de macrófagos no cérebro, e da ativação de astrócitos (Semple e cols., 2010).

Foram descritos aumentos da expressão de CCL2 em placas senis e na micróglia ativa de pacientes com Alzheimer (Ishizuka e cols., 1997). A formação da placa senil no Alzheimer ocorre em decorrência do acúmulo da proteína amiloide β e/ou pelo acúmulo de filamentos de tau.

- O CCR2

O CCR2 é um receptor acoplado a proteína G, contendo sete domínios transmembranares, apresentando uma região C-terminal (carboxi-terminal, apresentando uma carboxila) e outra N-terminal (amino-terminal, composta pelo grupo amina). A região N-terminal é o principal sítio de ligação do CCR2 com seus ligantes, enquanto que as outras regiões possuem um papel maior na



ativação de moléculas intracelulares (Monteclaro and Charo, 1996). A sinalização intracelular do CCR2 inibe adenilato ciclase e ativa a via da PI3K (Fosfatidilinositol cinase). O gene do CCR2 é composto por uma sequência genômica de 7kb, que é altamente conservada em Humanos, camundongos e ratos (Wong e cols., 1997).

Animais nocautes para o CCR2 são mais susceptíveis a sepse, relacionada com uma exacerbação do quadro inflamatório com aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios KC e IL-6 (24 horas após o CLP) e de MIF (6 e 24 horas após o CLP), bem como redução significativa dos níveis de IL-10 (24 horas após o CLP) (Gomes e cols., 2006).

No sistema nervoso central, o CCR2 quando ativado, induz uma cascata de sinalização intracelular com inativação da adenilato ciclase e redução de AMP cíclico e aumento da mobilização intracelular de cálcio e ativação da via da ERK fosforilada, tanto em células da glia, quando na microglia e no neurônio. Como podemos observar na figura 4.4, no astrócito o CCR2 ativado induz a síntese de citocinas como a IL-1 β , o CCR2 induz a migração e proliferação da microglia e induz a excitação neuronal, tendo participação importante na dor neuropática (Frank-Cannon e cols., 2009).

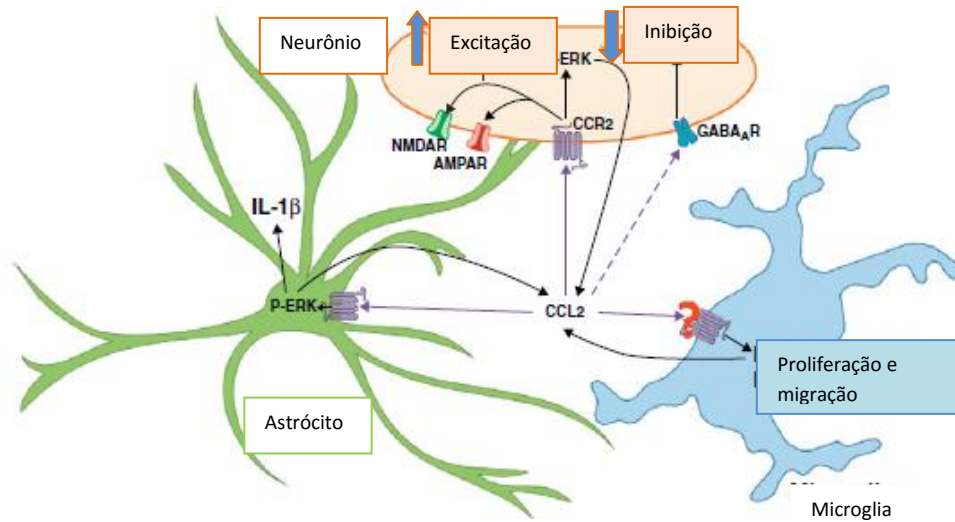


Figura 4.4. O CCR2 ativa a via da ERK em neurônios, astrócitos e microglia. Quando ativado, o CCR2 induz a liberação de citocinas por astrócitos, induz a migração e proliferação da microglia e aumenta a excitação neuronal. Fonte: (Frank-Cannon e cols., 2009).

Tanto o CCR2 quanto o CCL2 são expressos de forma constitutiva no sistema nervoso central, como no núcleo olfatório anterior, córtex cerebral, hipocampo, putamen, globo pálido, núcleo hipotalâmico paraventricular e supraoptico, amígdala, substância negra e no cerebelo. O CCL2 é encontrado também no núcleo gigantocelular reticular, núcleo trigeminal espinhal e motor, núcleo facial (Banisadr e cols., 2005a).

O CCL2 induz o aumento da mobilização intraneuronal em cultura primária de neurônios do córtex cerebral, do hipocampo, do hipotálamo e do mesencéfalo e pode estar relacionado com a comunicação interneuronal e possivelmente com a neurotransmissão dopaminérgica e colinérgica (Banisadr e cols., 2005a).

Guyon e cols. (2009) demonstrou que a injeção unilateral de CCL2 na dose de 50 ng (nanogramas) na substância negra aumenta a excitação neuronal, a liberação de dopamina e a atividade locomotora de ratos.

O CCL2 também aumenta a excitação neuronal e a transmissão sináptica por mecanismos pré-sinápticos em neurônios localizados no hipocampo de ratos (Zhou e cols., 2011), via liberação de glutamato e ativação de NMDA.

Diferentes mediadores inflamatórios são expressos no Sistema Nervoso Central e esses mediadores participam da fisiopatologia de doenças



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

neuroinflamatórias. Evidências recentes apontam o papel de quimiocinas no desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas. No entanto, não existem dados que demonstrem o papel do CCL2 e do seu receptor, o CCR2, na fisiologia do processo de aprendizado e consolidação de memória. Existem apenas dados que relatam que o CCL2 e o CCR2 são expressos de forma constitutiva em neurônios do hipocampo e são capazes de aumentar a excitabilidade neuronal. Por esse motivo, nós resolvemos analisar a importância do CCR2 na neurodegeneração, na densidade capilar funcional e no processo de consolidação de memória, utilizando como ferramenta de estudo, animais geneticamente deficientes para o CCR2 e animais C57BL6 “naive”. Avaliamos também os principais mecanismos fisiológicos responsáveis pela consolidação de memória.



5. Objetivos

5.1. Objetivo geral

Investigar se a ausência do CCR2 interfere no processo de aprendizado e na formação de memória, avaliando os principais mecanismos associados ao processo de consolidação de memória, bem como sua relação com neuroinflamação e neurodegeneração.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Averiguar o papel do receptor CCR2 no aprendizado e na consolidação de memória dos animais jovens em comparação com os animais idosos;
- Avaliar vias de sinalização ativadas no hipocampo durante a formação da memória dependente de CCR2;
- Analisar o papel do CCR2 na sinalização neuroinflamatória e na perfusão cerebral dos animais jovens em comparação com os animais idosos;
- Verificar a o papel do CCR2 na regulação da expressão da proteína amiloide β dos animais jovens em comparação com os animais idosos;



6. Materiais e métodos

Inicialmente avaliamos se a ausência do CCR2 interferia no processo de aprendizado e consolidação de memória dos animais jovens em comparação com os animais idosos, utilizando como testes a natação forçada e a esquiva passiva.

Nosso próximo passo foi verificar a expressão de mediadores importantes para o processo de consolidação de memória no hipocampo dos animais geneticamente deficientes para o CCR2 (CCR2^{-/-}).

Como os animais CCR2^{-/-} apresentaram comprometimento da cognição, nós resolvemos avaliar a expressão de proteína amiloide β no cérebro dos animais, bem como a neuroinflamação e a expressão de marcadores da via da apoptose.

Na tabela 1 podemos visualizar o número de animais utilizados em cada etapa do desenho experimental.

6.1. Animais

Utilizamos animais C57Bl6 machos e animais geneticamente deficientes para o CCR2 (CCR2^{-/-}) machos fornecidos pelo CECAL (Fiocruz, Brasil) com idade de 5 semanas, 10 semanas e 1 ano e meio. Os animais geneticamente deficientes para o CCR2 são homozigotos para a deficiência, confirmado por PCR. Durante a permanência dos animais no nosso biotério, os animais foram mantidos sob temperatura constante de 24°C com ciclo dia e noite regular, com acesso livre a água e a comida. Todos os experimentos estão de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA- Fiocruz), licença número LW36/10.



Experimento	Idade dos animais	Grupos experimentais
Natação forçada	Adultos Jovens (10 semanas)	8 animais C57BL6 e 8 animais CCR2-/-
Esquiva inibitória de múltiplos treinos	Jovens (5 semanas de idade)	5 animais C57BL6 e 5 animais CCR2-/-
Esquiva inibitória de múltiplos treinos	Adultos jovens (10 semanas)	18 animais C57BL6 e 8 animais CCR2-/-
Esquiva inibitória de um treino	Adultos jovens (10 semanas)	7 animais C57BL6 e 7 animais CCR2-/-
Natação forçada e esquiva inibitória de um treino	Idosos (1 ano e meio)	7 animais C57BL6 e 10 animais CCR2-/-
Esquiva inibitória de múltiplos treinos	Idosos (1 ano e meio)	7 animais C57BL6 e 7 animais CCR2-/-
Análise da Perfusão Cerebral	Jovens e idosos	3 animais C57BL6 Jovens; 4 animais C57BL6 Idosos; 4 animais CCR2-/- Jovens; 4 animais CCR2-/- Idosos

Tabela 1. Dados dos animais utilizados em cada etapa do desenho experimental.

6.2. Avaliação da memória contextual através do Morris Water Maze

Os animais utilizados nesse ensaio eram naive e não foram submetidos anteriormente a nenhum ensaio comportamental. Os animais foram colocados na piscina (caixa d'água, como podemos observar na figura 6.1) por 3 dias consecutivos, e dentro da piscina havia uma plataforma submersa colocada sempre no mesmo quadrante (Morris, 1984). A temperatura da água foi mantida a mesma do ambiente, em torno de 24 °C. A piscina apresentava pontos de referência. Em todos os dias nós colocamos os animais uma vez na piscina, mantendo sempre o mesmo ponto de partida e contamos o tempo que o animal demorava para encontrar a plataforma (tempo de latência a plataforma). No primeiro dia, se o animal não encontrasse a plataforma nós direcionávamos gentilmente para plataforma. O tempo máximo para o animal encontrar a plataforma era de 1 minuto. Não realizamos a contagem do tempo que o animal



permanecia na plataforma. No final do teste nós analisamos a curva de aprendizado. Os experimentos foram analisados no software N-Maze.



Figura 6.1. Caixa d'água utilizada no experimento de natação forçada. As dimensões da caixa d'água são: 0,84 metros de altura, 1,14 de diâmetro da base, 1,54 de diâmetro superior, comportando 1000 litros de volume.

Os grupos experimentais foram 7 animais C57BL6 e 10 animais CCR2^{-/-} com uma ano e meio de idade; 8 animais C57BL6 e 8 animais CCR2^{-/-} com 10 semanas de idade.



6.3. Esquiva passiva

6.3.1. “*Single trial*” – *esquiva de um treino*

O protocolo experimental foi baseado no protocolo descrito pelos autores (Reis e cols., 2010). Os animais utilizados nesse ensaio eram naive e não foram submetidos anteriormente a nenhum ensaio comportamental. Neste teste nós colocamos os animais na caixa de esquiva passiva. Esta caixa é composta por uma plataforma segura e uma grade de choque. Este teste foi composto por treino, teste da memória de curto prazo, 90 minutos após o treino e teste da memória de longo prazo, 24 horas após o treino. No treino e nos testes nós contamos o tempo que o animal permaneceu na plataforma segura, o tempo de latência a plataforma. Quando os animais desciam da plataforma segura e apoiavam as quatro patas na grade, eles recebiam um choque de intensidade de 0,7 mA por 3 segundos. O tempo máximo de latência a plataforma foi de 180 segundos.



Figura 6.2. Caixa utilizada no ensaio de esquiva inibitória. A caixa de esquiva inibitória consiste de uma plataforma de 2,5 cm de altura x 7,0 cm de largura x 25,0 cm de comprimento, localizada no lado direito de uma caixa de acrílico de 50 x 25 x 25 cm. O piso da caixa é formado por uma grade com uma série de barras paralelas de aço inoxidável (0,1 cm de diâmetro) espaçadas a cada 1,0 cm.

6.3.2. “*Multiple trial*” – *esquiva de múltiplos treinos*

O protocolo experimental foi baseado no protocolo descrito pelos autores Reis e cols. (2010). Os animais utilizados nesse ensaio eram naive e não foram submetidos anteriormente a nenhum ensaio comportamental. A esquiva de múltiplos treinos foi usada para analisar quantos treinos eram necessários para os animais aprenderem.



Neste teste, nós fizemos o número de treinos necessário para que o animal permanecesse por 3 minutos na plataforma segura. Neste teste nós contamos o tempo de latência a plataforma e o número de treinos necessários para o animal permanecer por 3 minutos na plataforma. Nós realizamos a análise da memória de curto prazo (90 minutos após o treino) e a memória de longo prazo (24 horas após o treino) e o esquecimento 7 e 8 dias após o treino. Na sessão treino, se o animal descesse da plataforma e apoiasse as quatro patas na grade, ele receberia um choque de 0.7mA por 3 segundos.

6.4. Ensaio de campo aberto e teste de inibição de pré-pulso (PPI)

Os animais utilizados nesse ensaio eram naïve e não foram submetidos anteriormente a nenhum ensaio comportamental. No ensaio de campo aberto, os animais foram colocados dentro da caixa de campo aberto por 5 minutos e nós contamos o número de cruzamentos (cruzamento de linhas quadriculares desenhadas no chão da caixa) e levantamentos (ficar em pé apoiado nas patas traseiras) dos animais.

Na inibição de pré-pulso, os animais foram colocados dentro da caixa, com a grade em seus pés, que estava conectada ao computador, que avaliava a resposta de sobressalto dos animais durante a exposição a um som de 120 dB.

6.5. Western blotting

Nós eutanaziamos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 naïve (que não foram submetidos a esquia passiva) e animais submetidos a esquia passiva nos tempos de 1 hora, 6 hora e 12 horas após o treino. Os animais foram eutanaziados com isoflurano, e perfundidos com solução salina por 10 minutos. Após este procedimento, nós removemos o cérebro dos animais e isolamos o hipocampo. O hipocampo foi macerado na presença de 100 µl de tampão RIPA com inibidores de protease e fosfatase. A amostra foi congelada em gelo seco e em seguida descongelada e centrifugada a 10000 RPM por 10 minutos. Após este procedimento, o sobrenadante da amostra foi coletado e quantificamos proteínas usando o Kit do BCA. 80 µg de proteína foram aplicados em cada poço do gel de eletroforese (12%). Após fazermos a corrida do gel, nós



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

transferimos as proteínas para a membrana do Odyssey. Após a transferência, nós incubamos a membrana com solução de bloqueio (PBS 1X + 5% de soro de albumina bovina + 0,05% of tween) por uma hora. Então a membrana foi incubada com anticorpos específicos, anti-p42-44 MAPK (cell signaling), anti-phospho-p42-44 MAPK (Cell signaling), anti-BDNF (Abcam – Ab6201), anti-PSD95 (Abcam – Ab18258) e anti-synaptophysin (Abcam – Ab8049), diluído em solução de bloqueio, por 24 horas. Nós usamos os anticorpos secundários conjugados com IRDye 680 RD (Li-cor - 926-68170) or IRDye 800cw (Li-cor - 824-08365). A membrana foi scaneada no Odyssey e a intensidade das bandas foram analisadas no software Image Studio™ da marca Li-cor, .

6.6. Imunohistoquímica

Os animais foram eutanaziados com isoflurano e perfundidos com solução salina por 10 minutos, seguido de PBS 1X contendo 4% de paraformaldeído por 5 minutos e com PBS1X acrescido de 10% de sacarose por 5 minutos. Após esse procedimento, nós removemos o cérebro dos animais, e incubamos com PBS 1X contendo 20% de sacarose por 24 horas, e com PBS1X contendo 30% de sacarose por 24 horas. Após esses procedimentos, os cérebros foram congelados em gelo seco e cortados em criostato (40 µm de espessura). As fatias de cérebro foram colocadas em lâminas gelatinizadas. Nós incubamos os cérebros primeiro com solução de bloqueio (tampão fosfato + 5% de soro de cabra com 0,05% de triton), após com anticorpos primários para detectar PSD95 e Sinaptofisina, proteína amiloide β, IBA-1 por 24 horas. No dia seguinte, as fatias de cérebro foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com alexa 594 (Life – A11012) e alexa 488 (Life - A11001). O núcleo foi corado com DAPI. Nós analisamos as fatias no microscópio de fluorescência e no microscópio confocal. A expressão de IBA-1 foi quantificada no software image J versão 1.48 desenvolvido pelo “National Institute of Health” (NIH) dos Estados Unidos (Instituto nacional de saúde).

6.7. Análises da microcirculação cerebral por microscopia intravital

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina (100 mg/Kg e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal), o animal foi mantido com ventilação espontânea. A visualização da microcirculação cerebral foi realizada



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

em seguida a uma craniotomia no osso parietal direito com o auxílio de uma broca, permitindo a exposição da membrana pia-máter (Araujo e cols., 2012). Esta janela craniana permite a observação dos vasos sanguíneos desta rede vascular que fica sob o feixe de luz (Carvalho-Tavares e cols., 2000; Svoboda e cols., 1997). O campo a ser observado foi continuamente mantido sob superfusão com líquido cefalorraquidiano artificial.

6.8. Avaliação da densidade capilar funcional

Após a administração i.v. de fluoresceína dextran (FITC-dextran 150), as imagens da microcirculação foram adquiridas através do software Archimed 3.7.0. A contagem de capilares foi feita com o auxílio do software Saisam 5.1.3. Foram feitas imagens seriadas com oculares de 10 x e objetivas de 10x com duração de 1 minuto para cada campo e calculadas por número de capilares por mm². Somente foram computados os capilares perfundidos continuamente (densidade capilar funcional) (Sabino e cols., 2008). Após o procedimento todos os animais foram sacrificados.

6.9. Avaliação da interação leucócito-endotélio

Para marcação dos leucócitos circulantes, foi feita a administração i.v. de 0,3 mg/kg de rodamina 6G e os leucócitos com a fluorescência associada foram visualizados através da microscopia descrita acima. A interação leucócito-endotélio foi avaliada determinando, como leucócitos aderidos, os que permaneceram estáticos ao longo de 100 µm da parede venular por um período de 30 segundos e como rolantes, quando as células marcadas se moviam dentro do vaso em velocidade inferior aos eritrócitos circulantes e foi expressa em número de células/min.

6.10. Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral por Laser Speckle

O fluxo sanguíneo cerebral foi avaliado nos animais com a janela craniana crônica já implantada previamente. Os animais foram anestesiados com alfa-cloralose (25 mg/kg, i.p.) e colocados sob um sistema de laser Speckle com contraste de imagem com comprimento de onda de 785 nm para medida contínua da perfusão sanguínea tecidual em tempo real. Fizemos 16 imagens/seg. As imagens



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

foram analisadas utilizando o software do fabricante. Após os animais se recuperarem do procedimento anestésico, os mesmos voltaram para o biotério.

6.11. Análise estatística

Os dados foram plotados no software GraphPad Prism versão 5 produzido pela GraphPad Prism Software, inc. No “water maze” utilizamos teste não paramétrico kruskal-Wallis, utilizando o teste Dunn’s de comparação múltipla como pós teste. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando apresentaram $p \leq 0.05$.

Na esquiva passiva de múltiplos treinos, nós usamos o teste “one way anova” como teste estatístico. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando apresentaram $p \leq 0.05$.

Nos gráficos de coluna (Esquiva passiva, PPI, campo aberto, densitometria do western blotting, e intensidade de fluorescência da imunohistoquímica) a diferença estatística foi avaliada através do T-test onde os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando apresentaram $p \leq 0.05$.



7. Resultados e discussão

O processo de aprendizado e memória é fundamental para a realização de atividades do dia a dia. Aprendemos a caminhar, a pensar, a planejar. O aprendizado e a formação da memória envolvem regiões específicas do Sistema Nervoso Central (Izquierdo, 2011).

A memória é classificada em: memória imediata, quando formada em segundos; memória recente, que ocorre em horas; memória remota, que permanece por meses ou anos. A formação da memória depende das informações obtidas a partir dos nossos sentidos. A memória recente (de curto prazo) é armazenada no hipocampo e na amígdala (Izquierdo, 2011). A memória de curto prazo é instável e poderá ser consolidada ou não, se for consolidada ela dá origem a memória de longo prazo. Poucos dados na literatura reportam a importância de quimiocinas e citocinas no processo de aprendizado e formação de memória. Tanto o CCL2 quanto o CCR2 são expressos de forma constitutiva no hipocampo, por esse motivo resolvemos analisar a participação do CCR2 na formação da memória.

Inicialmente, antes de analisarmos a cognição dos animais, nós verificamos se os animais geneticamente deficientes para o CCR2 (CCR2^{-/-}) apresentavam alteração motora através do ensaio em campo aberto (“Open Field”), da análise da velocidade do nado forçado (“Water maze”) e atividade reflexa através do ensaio de inibição de pré-pulso (PPI, que vem do inglês pre-pulse inhibitory).

Nós realizamos o ensaio em campo aberto em animais CCR2^{-/-} machos com 10 semanas de idade e em animais C57BL6 machos com 10 semanas de idade. No ensaio em campo aberto, nós colocamos o animal na caixa, que contém 16 quadrantes e contamos o número de quadrantes que os animais cruzam (cruzamento, que vem do inglês “crossing”) e o número de elevações, onde o animal fica suspenso sob as duas patas traseiras (que vem do inglês “rearing”). A duração do ensaio em campo aberto foi de 5 minutos.

Como podemos ver na figura 7.1, os animais CCR2^{-/-} apresentam número de quadrantes cruzados (Figura 7.1A, aproximadamente 100 quadrantes tanto no CCR2^{-/-} quanto no C57BL6) e de levantamentos similares aos animais C57BL6 (Figura 7.1B, aproximadamente 35 levantamentos no grupo CCR2^{-/-} e 25



levantamentos no grupo C57BL6). O ensaio de campo aberto é muito utilizado para avaliar a atividade locomotora do animal, como o animal explora o ambiente e também a ansiedade do animal (Christmas and Maxwell, 1970; Prut and Belzung, 2003). Esses dados sugerem que o animal CCR2 $-/-$ e os animais C57BL6 apresentam a resposta motora preservada, não sugerindo depressão ou ansiedade, uma vez que ambos os grupos exploram a caixa da mesma forma. O ensaio de campo aberto é utilizado no estudo do efeito de ansiolíticos, como os benzodiazepínicos (Prut and Belzung, 2003). Animais com quadro de ansiedade apresentam aumento do número de cruzamentos ou levantamentos, percorrendo uma distância maior na caixa, em comparação com animais saudáveis. O ensaio de campo aberto é utilizado também para avaliar a capacidade cognitiva do animal. No entanto, o teste é compreendido por dois dias, onde o primeiro dia é feito o treino, onde o animal irá explorar mais o ambiente, uma vez que o ambiente é novo pra ele. No dia do teste, 24 horas após o treino, como o animal se recorda da caixa, a tendência é que ele explore menos o ambiente, apresentando número de cruzamentos e de levantamentos significativamente menor, em comparação com o treino. No entanto, quando o animal apresenta comprometimento da cognição, o número de cruzamentos ou levantamentos, permanece igual, quando comparados o dia do teste com o dia do treino. Esse teste foi utilizado por Reis e cols. (2010) para analisar a cognição de animais durante a infecção murina por *Plasmodium berghei* ANKA, assim como em animais sobreviventes da sepse (Tuon e cols., 2008).

Nós também realizamos a natação forçada, filmando a natação dos animais com auxílio de uma webcam. A webcam estava conectada ao computador e a análise dos vídeos foi realizada no software Any Maze, para avaliar a velocidade de nado dos animais durante 5 minutos. Como podemos observar na figura 7.2, os animais CCR2 $-/-$ se deslocam da mesma forma que os animais C57BL6. E esse dado sugere que o animal tem atividade motora preservada. Quando o animal apresenta alteração motora, a velocidade de nado encontra-se reduzida (Duclot e cols., 2012; Vozeh e cols., 2006).

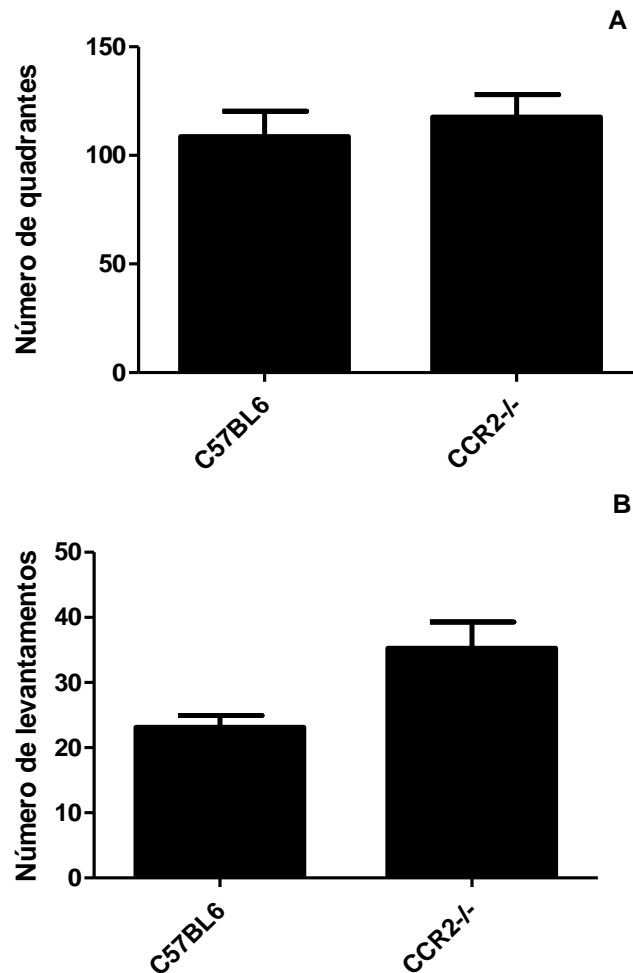


Figura 7.1. Atividade motora dos animais CCR2-/- e C57BL6 no ensaio de campo aberto. Os animais CCR2-/- e C57BL6 foram submetidos ao ensaio em campo aberto, onde analisamos a atividade motora dos animais na caixa do ensaio de campo aberto no período de 5 minutos. Para avaliar a atividade motora dos animais nós realizamos a contagem do número de quadrantes cruzados e o número de levantamentos realizados pelos animais. Os animais CCR2-/- e C57BL6 apresentam o número de quadrantes cruzados e o número de levantamentos similares. Os grupos experimentais consistem de 7 animais por grupo. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média).

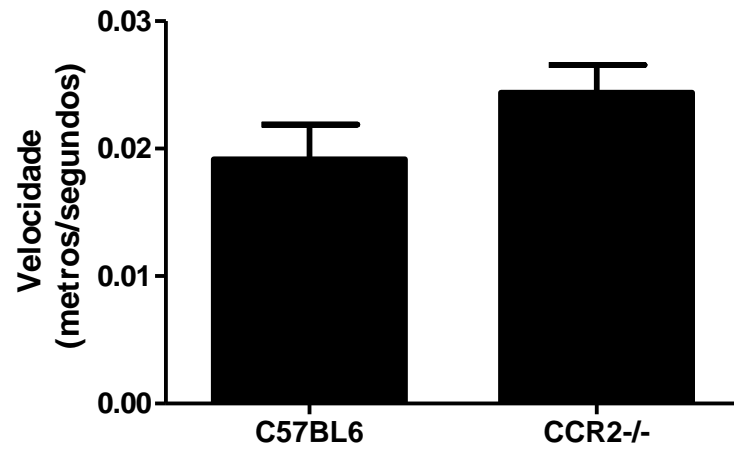


Figura 7.2. Velocidade de natação dos animais CCR2-/- e C57BL6 durante a natação forçada. Os animais CCR2-/- e C57BL6 foram submetidos a natação forçada. Os animais foram colocados na piscina por 5 minutos. A velocidade do nado dos animais na piscina no software Any maze. Os animais CCR2-/- e C57BL6 apresentam velocidade de nado. Os grupos experimentais consistem de 7 animais por grupo. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média).



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

O reflexo dos animais foi explorado através da inibição de pré-pulso (PPI). Neste teste avaliamos se o sobressalto dos animais foi similar no estímulo auditivo forte, para verificar se o reflexo dos animais (sobressalto) em resposta ao estímulo auditivo estava preservado. O sobressalto está representado na figura 7.3 como unidade arbitrária. Como podemos observar o sobressalto foi similar entre os animais C57BL6 e CCR2 $-/-$. E esse dado sugere que o animal tem a resposta reflexa preservada. O teste do PPI avalia a resposta sensório-motora e é amplamente utilizado para avaliar modelos de esquizofrenia em animais. Em modelos de animais esquizofrênicos a resposta ao pré-pulso não é inibida (Buccafusco and Buccafusco, 2009), e a resposta reflexa do animal é a mesma independente da intensidade do estímulo auditivo.

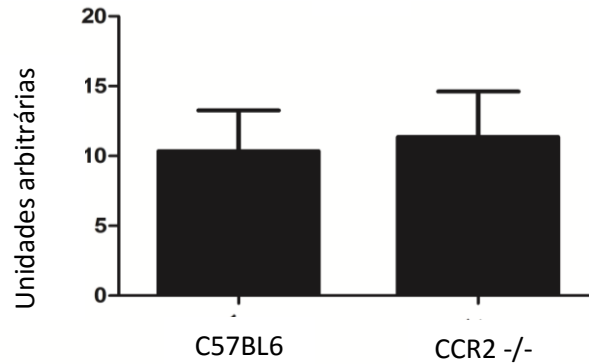


Figura 7.3. Atividade reflexa dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 em resposta ao estímulo auditivo. Os animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foram colocados dentro de uma caixa, presa numa grade, que contém um sensor que detecta o movimento das patas dos animais e envia as informações para o computador. Nós avaliamos a resposta de sobressalto dos animais (reflexo) quando estimulados com estímulo auditivo de 120 Db. Essa resposta de sobressalto está representada no eixo Y do gráfico, como unidade arbitrária. Os animais CCR2^{-/-} e C57BL6 apresentam a resposta de sobressalto similar, indicando que o reflexo dos animais encontra-se preservado. Os grupos experimentais consistem de 7 animais por grupo. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média).



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Como os animais não apresentaram alteração da atividade motora e nem do reflexo, nosso próximo passo foi analisar o aprendizado dos animais através da natação forçada e da esQUIVA inibitória de múltiplos treinos. Avaliamos também a consolidação de memória de curto prazo e de longo prazo na esQUIVA inibitória de um treino.

Realizamos o Morris Water Maze dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 com 10 semanas de idade (Jovem) por 3 dias consecutivos (figura 7.4). Em cada dia, os animais eram colocados na piscina e fizemos a contagem do tempo de latência dos animais para encontrar a plataforma. O tempo máximo de latência era de 1 minuto, da mesma forma como descrito por Buccafusco and Buccafusco (2009). Adotamos esse tempo, pois quando deixamos os animais em tempo superior a um minuto eles param de nadar e começam a flutuar na piscina.

Como podemos observar na figura 7.4, os animais C57BL6 com 10 semanas de idade (Figura 7.4) aprenderam no terceiro dia do teste, com tempo aproximado de latência no terceiro dia de 20 segundos. Os animais CCR2^{-/-} jovens (Figura 7.4) não aprendem no terceiro dia da natação, apresentaram tempo de latência em torno de 35 segundos. Esses dados nos indicam que os animais geneticamente deficientes para o CCR2 possuem prejuízo da cognição. A natação forçada aumenta a motivação do animal para aprender e formar a memória, fazendo com que ele escape de forma mais rápida da piscina ao subir na plataforma submersa (Buccafusco and Buccafusco, 2009). Os animais não flutuaram durante o teste. A natação avalia o aprendizado e a memória espacial.. Por isso o resultado observado na figura 7.4, sugere que o CCR2 ^{-/-} apresenta comprometimento do aprendizado e da memória espacial. Algumas doenças podem alterar a resposta dos animais na natação forçada. Animais sépticos também demoram mais tempo para encontrar a plataforma em comparação com os animais não infectados (Barichello e cols., 2007). Animais transgênicos para a proteína precursora da amiloide β com acúmulo de proteína amiloide β no cérebro, também apresentam comprometimento da memória espacial (Hsiao e cols., 1996; Puolivali e cols., 2002).

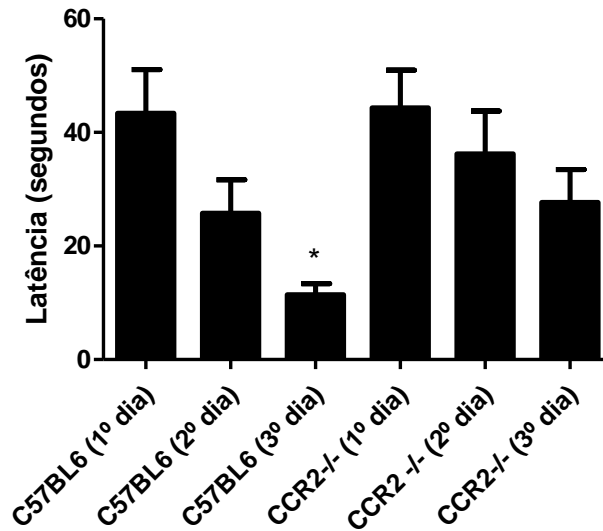


Figura 7.4. Curva de aprendizado dos animais CCR2-/- e C57BL6 no “water maze”. Os animais CCR2-/- e C57BL6 foram submetidos à natação forçada por 3 dias consecutivos (com tempo de teste de 1 minuto). Realizamos a análise do tempo de latência nos três dias, e os dados foram plotados em forma de curva de aprendizado. No “water maze” os animais foram colocados dentro da piscina por um minuto e nós contamos o tempo que os animais demoravam a encontrar a plataforma submersa na piscina (latência). Durante a realização do teste nós observamos que os animais não flutuam. * Representa diferença estatística em relação ao 1º dia da natação forçada. Curva de aprendizado nos animais com 10 semanas de idade. Os animais C57BL6 jovens aprendem no terceiro dia do teste, com redução significativa do tempo de latência em relação ao primeiro dia do teste do grupo C57BL6. Já os animais CCR2-/- não aprendem no terceiro dia, onde o tempo de latência não foi diferente estatisticamente em relação ao primeiro dia do grupo de animais CCR2-/-. Os grupos experimentais consistem de 8 animais, sendo representativo de dois experimentos. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença estatisticamente significativa do grupo C57BL6 (3º dia) quando comparado com o grupo C57BL6 (1º dia).



Além da memória espacial, nós analisamos a curva de aprendizado e a formação da memória aversiva dos animais. Nós analisamos o aprendizado através da esQUIVA inibitória de múltiplos treinos, em animais com 5 semanas de idade (Figura 7.5) e em animais com 10 semanas (Figura 7.6), com o intuito de identificar quando os animais começam a apresentar as alterações cognitivas.

A figura 6 representa a curva de aprendizado nos animais com 5 semanas de idade. Como podemos observar os animais CCR2^{-/-} precisam de mais treinos para aprender, cerca de 7 treinos, em comparação com o grupo de animais C57BL6, que precisaram de cerca de 4 treinos para aprender. No entanto após os 7 treinos os animais CCR2^{-/-} possuem as memórias de curto prazo (Figura 7.5C) e de longo prazo preservadas (Figura 7.5D), da mesma forma que os animais C57BL6. E não ocorre o decaimento da memória 7 dias após a esQUIVA. Esses dados sugerem que os animais CCR2^{-/-} precisam de mais treinos para que haja a formação da memória, mas seu sistema de consolidação e preservação da memória permanece intacto. O mesmo dado foi observado nos animais CCR2^{-/-} com 10 semanas de idade (Figura 7.6), que precisaram de 8 treinos para aprender, enquanto que os animais C57BL6 precisaram de cerca de 4 treinos para aprender. E após esses 8 treinos os animais CCR2^{-/-} apresentam a memória de curto prazo e a memória de longo prazo preservadas, da mesma forma que os animais C57BL6. No entanto, o decaimento da memória ocorre de forma mais rápida nos animais CCR2^{-/-} com 10 semanas de idade do que nos animais C57BL6. Esses dados sugerem que os animais CCR2^{-/-} com 10 semanas de idade precisam de mais treinos para aprender e depois que aprendem conseguem formar as memórias de curto e de longo prazo. No entanto, a memória não é sustentada por longos períodos. A curva de aprendizado é importante, pois ela auxilia na formação da memória de curto prazo e de longo prazo, uma vez que os animais foram treinados até conseguirem aprender. Esses mesmos dados são observados em humanos, onde quanto maior é a quantidade de treinos, maior é o aprendizado e a formação da memória (Abend e cols., 2013)

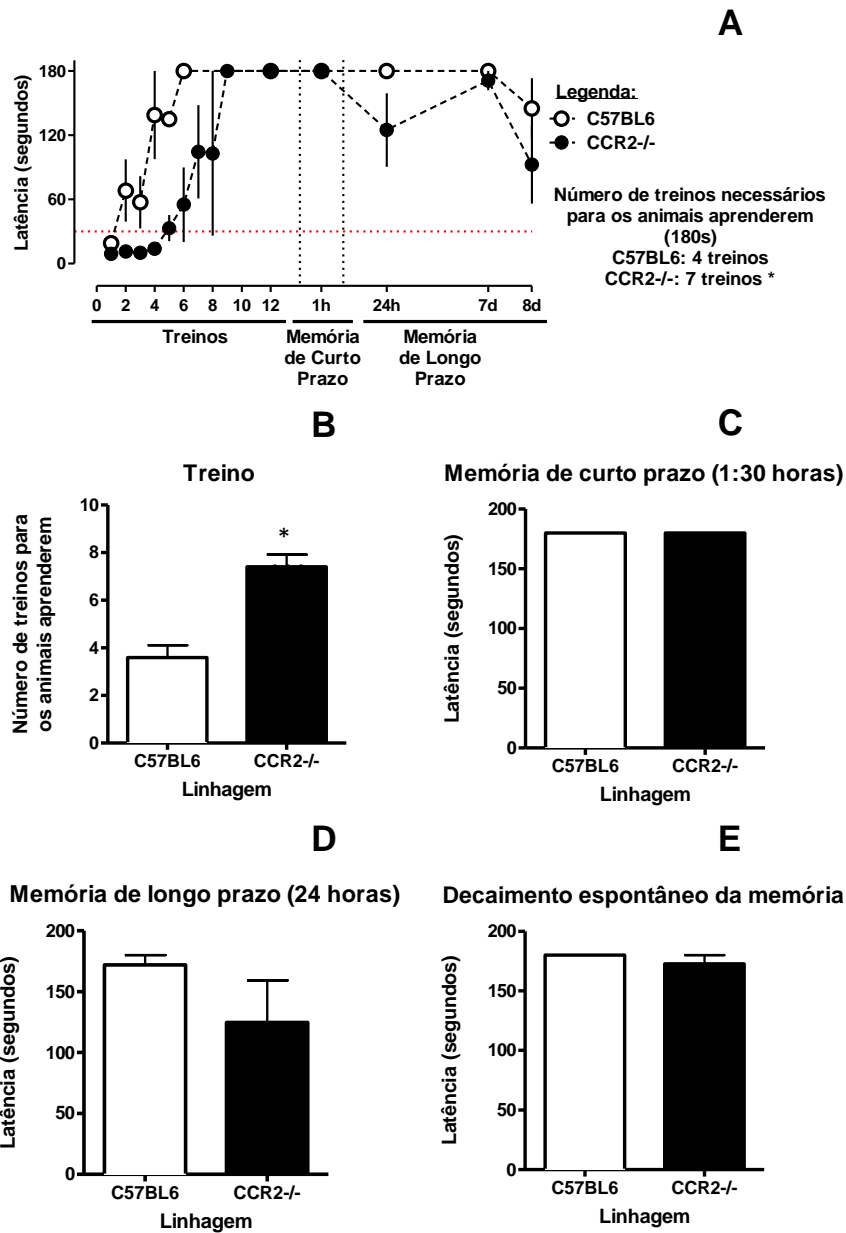


Figura 7.5. Curva de aprendizado dos animais CCR2-/- e C57BL6 com 5 semanas de idade na esqui
inibitória. Os animais CCR2-/- e C57BL6 foram submetidos à esqui de múltiplos treinos. Nós colocamos os animais na caixa da esqui, por 180 segundos e contamos o tempo que os animais permaneceram na plataforma segura (tempo de latência). (A e B) Realizamos o (s) treinamento (s) dos animais até que eles permanecessem por 180 segundos na plataforma. Uma hora e meia após o último treino de cada animal, avaliamos a (A e C) memória de curto prazo (A e D) e 24 horas após o último treino avaliamos a memória de longo prazo (A e D), da mesma forma que aos animais C57BL6. (A e E) Sete dias após o treino, realizamos novamente a esqui passiva, para verificar o decaimento da memória. (A e B) Os animais CCR2-/- precisam de mais treinos para aprender (cerca de 7 treinos) em comparação com os C57BL6 (que necessitam de cerca de 4 treinos para aprender). Após os múltiplos treinos na esqui, os animais CCR2-/- conseguem formar a memória de curto prazo (A e C) e de longo prazo (A e D), da mesma forma que aos animais C57BL6. (A e E) Os animais C57BL6 e CCR2-/-, não possuem decaimento da memória, 7 e 8 dias após a esqui. Os grupos experimentais consistem de 5 animais, sendo representativo de dois experimentos. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa do grupo C57BL6 (3º dia) quando comparado com o grupo C57BL6 (1º dia), com $p \leq 0,05$ (teste T).

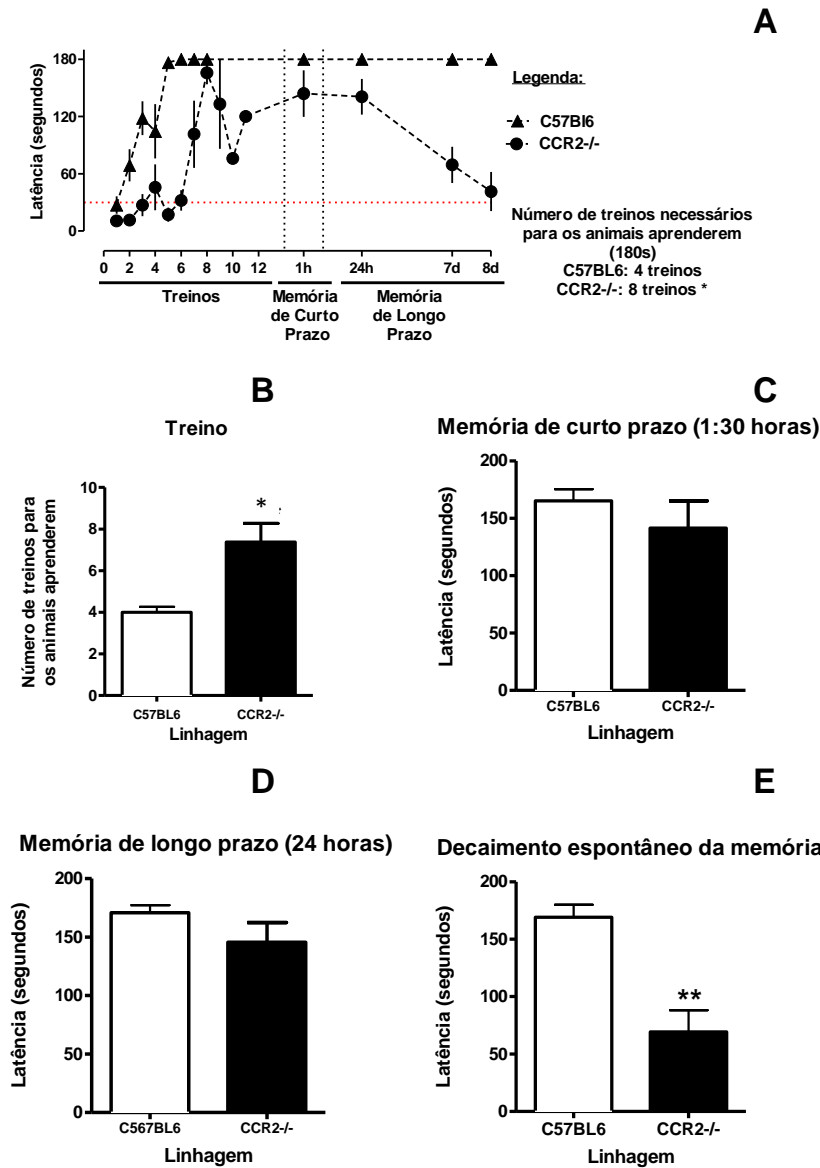


Figura 7.6. Curva de aprendizado dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 com 10 semanas de idade na esquiwa inibitória. Os animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foram submetidos à esquiwa de múltiplos treinos. Nós colocamos os animais na caixa da esquiwa, por 180 segundos e contamos o tempo que os animais permaneceram na plataforma segura (tempo de latência). (A e B) Realizamos o (s) treinamento (s) dos animais até que eles permanecessem por 180 segundos na plataforma. Uma hora e meia após o último treino de cada animal, avaliamos a (A e C) memória de curto prazo (A e D) e 24 horas após o último treino avaliamos a memória de longo prazo. (A e E) Sete dias após o treino, realizamos novamente a esquiwa passiva, para verificar o decaimento da memória. (A e B) Os animais CCR2^{-/-} precisam de mais treinos para aprender (cerca de 4 treinos) em comparação com os C57BL6 (cerca de 4 treinos). Após os múltiplos treinos na esquiwa, os animais CCR2^{-/-} conseguem formar a memória de curto prazo (A e C) e de longo prazo (A e D), da mesma forma que aos animais C57BL6. (A e E) Os animais C57BL6 e CCR2^{-/-}, não possuem decaimento da memória, 7 e 8 dias após a esquiwa. O grupo C57BL6 consiste de 18 animais e o grupo CCR2^{-/-} consiste de 8 animais, sendo representativo de dois experimentos. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença estatisticamente significativa do grupo C57BL6 (3^o dia) quando comparado com o grupo C57BL6 (1^o dia), com $p \leq 0,05$ (teste T).



Como os animais CCR2^{-/-} precisam de mais treinos na esQUIVA inibitória, resolvemos analisar a memória dos animais na esQUIVA passiva de um treino. Para focar apenas no papel do CCR2 no processo de formação da memória de curto prazo e de longo prazo.

A esQUIVA passiva de um treino foi realizada em animais CCR2^{-/-} e em animais C57BL6 com 10 semanas de idade (Figura 7.7). Na esQUIVA passiva de um treino, nós colocamos o animal na plataforma segura do aparato de esQUIVA e contamos o tempo de latência na plataforma. Quando o animal desce para a grade, ele recebe choque nas 4 patas com a intensidade de 700 mA por 3 milissegundos. Uma hora e meia (memória de curto prazo) e 24 horas após (memória de longo prazo), realizamos o teste da esQUIVA inibitória. No teste nós contamos também o tempo de latência dos animais na plataforma.

Como podemos observar na figura 7.7, os animais C57BL6 com 10 semanas apresentam tempo de latência na plataforma de aproximadamente 180 segundos, tanto 1:30 e 24 horas após o treino, indicando que os animais apresentam a memória de curto prazo e de longo prazo preservadas. Os animais CCR2^{-/-} com 10 semanas apresentam comprometimento da memória de curto prazo e de longo prazo após um treino na esQUIVA passiva (Figura 7.7), com média de tempo de latência na plataforma de cerca de 60 segundos (1:30 e 24 horas após o treino). Esses dados sugerem que o CCR2 é importante para a formação da memória de curto prazo e de longo prazo na esQUIVA passiva.

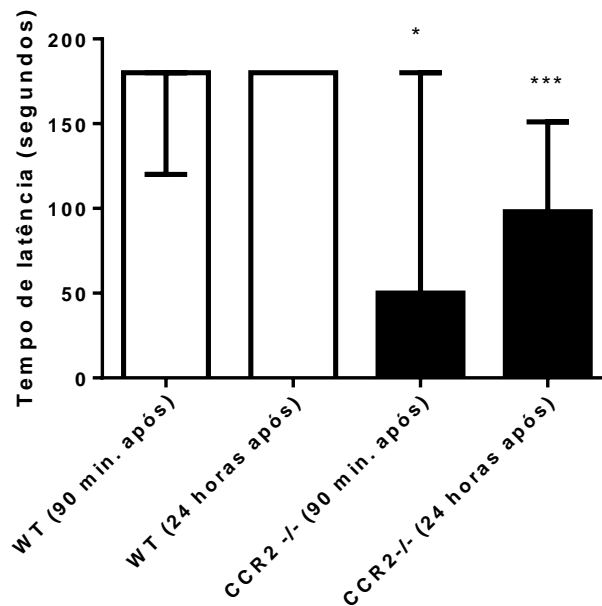


Figura 7.7. Tempo de latência a plataforma dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 na esquiwa inibitória. Os animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foram submetidos à esquiwa passiva com um treino. Na esquiwa nós colocamos os animais na caixa da esquiwa, por 180 segundos e contamos o tempo que os animais permaneceram na plataforma segura (tempo de latência). Realizamos o treinamento dos animais até que eles permanecessem por 180 segundos na plataforma. Uma hora e meia, contadas a partir do último treino de cada animal avaliamos a memória de curto prazo e 24 horas após o último treino para avaliar a memória de longo prazo. O grupo C57BL6 consiste de 5 animais, sendo representativo de dois experimentos. O grupo CCR2^{-/-} consiste de 7 animais, sendo representativo de dois experimentos. Os resultados representam a mediana e intervalo. O asterístico (*) representa diferença significativamente estatística entre o grupo CCR2^{-/-} (90 min. após) e o grupo C57BL6 (90 min. após), com $p \leq 0,05$ (teste one way anova). Os asterísticos (***) representam diferença significativa entre o grupo CCR2^{-/-} (24 horas após) e o grupo C57BL6 (24 horas após), com $p \leq 0,05$ (teste one way anova).

Além do CCL2, outros mediadores inflamatórios, tais como citocinas parecem ter também um papel importante na formação da memória. A IL-1 β em níveis fisiológicos é importante para o LTP (potenciação de longo prazo) no hipocampo (Ross e cols., 2003), no entanto em níveis muito elevados, a IL-1 β inibe a LTP (Ross e cols., 2003). A IL-1 β é importante para a consolidação da memória espacial e da memória aversiva (Yirmiya e cols., 2002). Animais geneticamente deficientes para o receptor da IL-1 do tipo 1, apresentam comprometimento da consolidação de memória e neurogênese (Avital e cols., 2003). A IL-6 também parece ter um papel importante na consolidação da memória, uma vez que animais geneticamente



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

deficientes para a IL-6 apresentavam a consolidação de memória prejudicada no teste de reconhecimento de objetos (Hryniewicz e cols., 2007). Animais geneticamente deficientes para o TNF- α ou para os receptor TNF do tipo 1 (TNF-R1) e TNF do tipo 2 (TNF-R2) também apresentam a consolidação da memória prejudicada (Baune e cols., 2008).

Vários estudos tem focado no papel do CX3CL1/CX3CR1 em condições patológicas, mas o CX3CL1/CX3CR1 também tem um papel fisiológico no processo de cognição. Animais geneticamente deficientes para o CX3CR1 apresentam comprometimento da cognição avaliada nos testes de habituação de campo aberto e de natação forçada. E essa alteração da cognição está associada a redução da LTP no hipocampo (Rogers e cols., 2011). O CX3CL1 tem um papel na plasticidade sináptica envolvida com a consolidação de memória (Sheridan e cols., 2014).



Como o animal deficiente para o CCR2 tem o aprendizado retardado e a consolidação da memória prejudicada, nós resolvemos analisar os níveis de mediadores envolvidos com a consolidação da memória no cérebro dos animais 1 hora e 12 horas após o treino na esquiwa passiva.

Kim e cols. (2012), demonstraram que a consolidação de memória ocorre após a ativação da via de CREB, da via da ERK e da cálcio-calmodulina (CaMKII). Resolvemos analisar a expressão da ERK fosforilada no hipocampo, uma hora após o treino na esquiwa passiva, uma vez que a ERK é ativada durante o processo de consolidação de memória. Como podemos observar na figura 7.8, os animais geneticamente deficientes para o CCR2, apresentaram redução na expressão da ERK fosforilada no hipocampo em comparação com os animais controle C57BL6. No entanto, a expressão de ERK total encontrava-se preservada. A correlação entre o CCR2 e a via da ERK já foi observada num estudo realizado pelo nosso grupo, onde o CCL2 aumenta a expressão de ERK em macrófagos peritoneais ativados com LPS (Fonseca e cols.). Dados na literatura demonstram que a ativação da via da ERK ocorre via receptor NMDA (Camarota e cols., 2000) e a ativação da via da ERK é importante para a síntese do BDNF (Alonso e cols., 2004; Citron, 2002).

Nosso próximo passo foi verificar a expressão de BDNF (proteína envolvida com a consolidação de memória) no hipocampo dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6, 12 horas após o treino na esquiwa passiva. Como podemos observar na figura 9, os animais CCR2^{-/-} apresentaram menor expressão de BDNF maduro no hipocampo em comparação com os animais C57BL6.

Como demonstrado por Alonso e cols. (2004), a via da ERK induz a tradução e a transcrição do BDNF. A redução da ativação da via da ERK observada na figura 7.9, poderia explicar porque os animais geneticamente deficientes para o CCR2 apresentam redução da expressão de BDNF (Figura 9).

Já é bem descrito na literatura que o BDNF está envolvido com o processo de consolidação de memória. A redução da expressão de BDNF observada na figura 9, poderia explicar o prejuízo cognitivo observado na figura 7.7. A sigla BDNF vem do inglês, "Brain neurotrophic factor". Quando o BDNF é liberado ele se liga ao seu receptor o TRkB que induz uma cascata de sinalização intracelular, que culmina com



a ativação da via da ERK e CREB. O efeito da ativação dessa cascata é a plasticidade neural e a formação de novas sinapses, que são responsáveis pela formação da memória (Yamada and Nabeshima, 2003). O BDNF é importante para a plasticidade neural, aumenta a densidade das espinhas dendríticas de neurônios piramidais na região CA1, além de aumentar a transmissão sináptica em neurônios do hipocampo (Lessmann e cols., 1994). O BDNF interfere na dinâmica da vesícula pré-sináptica contendo a sinaptofisina, aumentando a co-localização entre a sinaptofisina e o PSD95 (Bamji e cols., 2006).

Como os animais CCR2^{-/-} apresentam comprometimento cognitivo, com redução da expressão de BDNF, nós resolvemos analisar se os animais apresentavam alteração sináptica no hipocampo. Verificamos a expressão de sinaptofisina e PSD95 por western blotting, bem como o índice de co-localização entre a sinaptofisina e o PSD95 através da imunohistoquímica. Como podemos observar na figura 7.10, os animais CCR2^{-/-} apresentam redução da expressão de sinaptofisina e, no entanto a expressão de PSD95 é similar entre o grupo de animais CCR2^{-/-} e C57BL6.

Como há redução da expressão da sinaptofisina, ocorre redução da co-localização entre o PSD95 e a sinaptofisina, como pode ser visualizado na figura 7.11. Dados na literatura reportam que na esquizofrenia ocorre redução da expressão da sinaptofisina no hipocampo (Eastwood e cols., 1995). No entanto, o teste da inibição de pré-pulso não se encontra alterado (dados não mostrados). Doenças familiares que causam demência (Garringer e cols., 2013), diabetes do tipo 1 e do tipo 2 (Duarte e cols., 2012), o envelhecimento (Davies e cols., 2003) e o Alzheimer (Callahan e cols., 1999) reduzem a expressão da sinaptofisina.

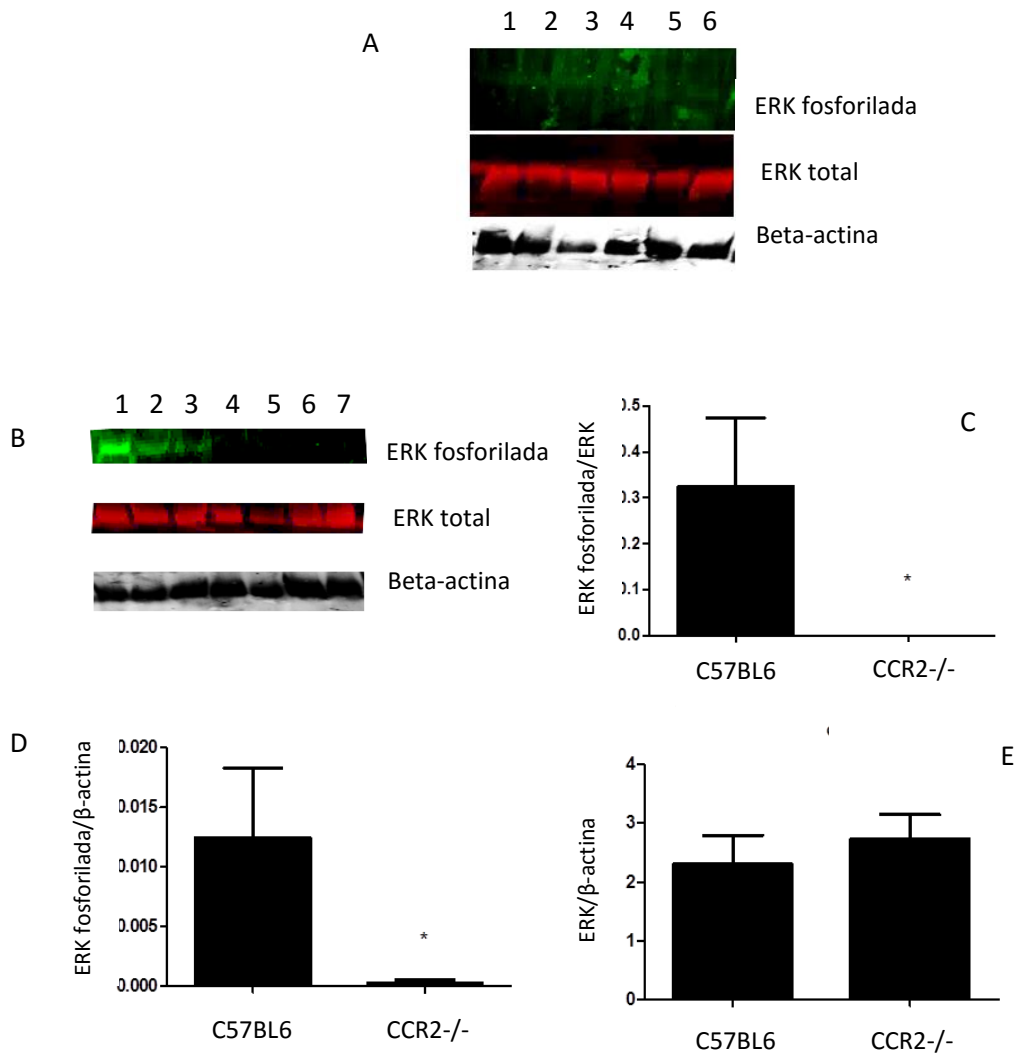


Figura 7.8. Expressão de ERK fosforilada no hipocampo de animais CCR2^{-/-} e C57BL6 uma hora após um treino na esquiça passiva. Animais CCR2^{-/-} e C57BL6 (10 semanas) foram submetidos a esquiça de um treino (0.7 mA, 3s) e uma hora após, os animais foram perfundidos com salina. O hipocampo foi dissecado e preparado para análise por western blotting. **(A)** Western representativo da ERK total e da ERK fosforilada em animais naive (que não foram submetidos a esquiça passiva) AS bandas 1, 2 e 3 = C57BL6; As bandas 4, 5 e 6= CCR2^{-/-}. **(B)** Western representativo da ERK total e fosforilada em animais CCR2^{-/-} e C57BL6 1 hora após a esquiça passiva, bem como da beta-actina, usada como normalizador da quantidade de proteína. As bandas 1, 2 e 3= C57BL6; As bandas 4, 5, 6, 7= CCR2^{-/-}. **(C)** Densitometria da ERK fosforilada da figura B, normalizada pela ERK total. **(D)** Densitometria da ERK fosforilada da figura B, normalizada pela β -actina. **(E)** Densitometria da ERK total, normalizada pela β -actina. **(A)** Os grupos experimentais consistem de 3 animais, sendo representativo de dois experimentos. **(B)** O grupo C57BL6 consiste de 3 animais, sendo representativo de dois experimentos. O grupo CCR2^{-/-} consiste de 4 animais, sendo representativo de dois experimentos. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença significativamente estatística entre o grupo CCR2^{-/-} e o grupo C57BL6, com $p \leq 0,05$ (teste T).

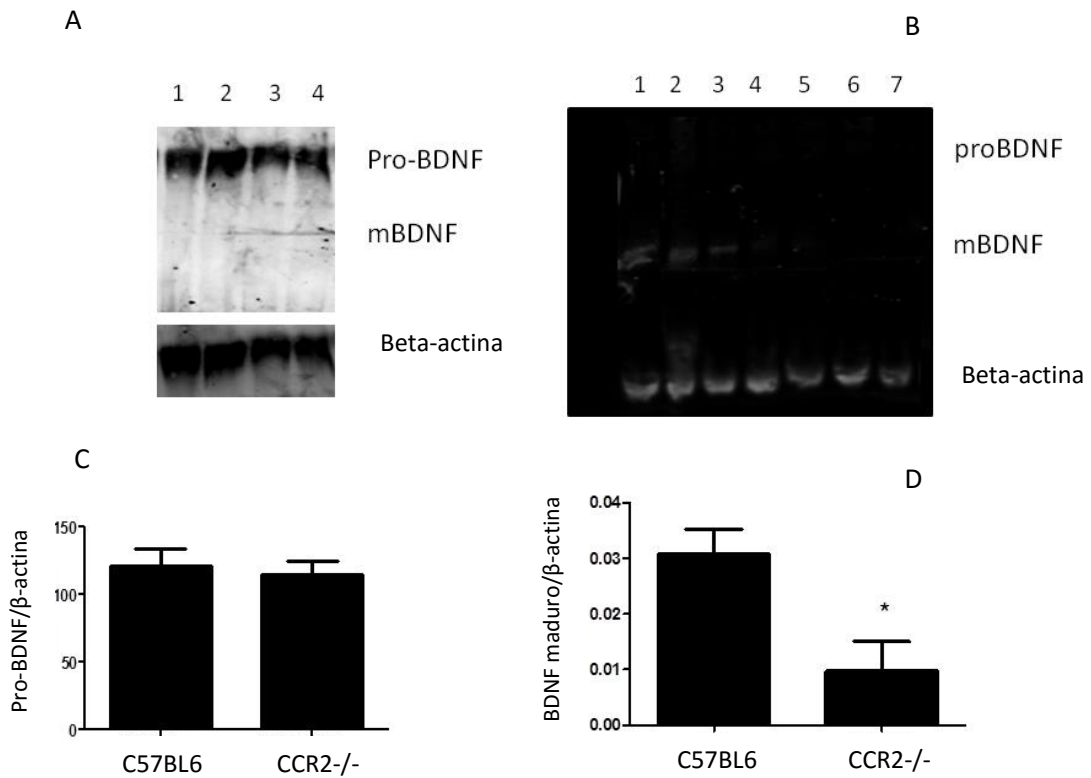


Figura 7.9. Expressão de BDNF no hipocampo de animais CCR2^{-/-} e C57BL6, 12 horas após o treino na esqui passiva. Animais CCR2^{-/-} e C57BL6 (10 semanas) foram submetidos a esqui de um treino (0.7 mA, 3s) e doze horas após, os animais foram perfundidos com salina. O hipocampo dos animais C57BL6 e CCR2^{-/-} foi dissecado e preparado para análise por western blotting. **(A)** Western blotting do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) antes da esqui passiva e beta-actina que é o controle do carregamento de proteína. Bandas 1 e 2= C57BL6, Bandas 3 e 4=CCR2^{-/-} **(B)** Western blotting para BDNF representativo do hipocampo de animais 12 horas após a esqui passiva e beta-actina que é o controle do carregamento de proteína. As bandas 1, 2 e 3= C57BL6; As bandas 4, 5, 6, 7= CCR2^{-/-}. **(C)** Densitometria do BDNF da figura A, normalizada pela β -actina. **(D)** Densitometria do BDNF da figura B, normalizada pela β -actina. **(A)** Os grupos experimentais consistem de 3 animais, sendo representativo de dois experimentos. **(B)** O grupo C57BL6 consiste de 3 animais. O grupo CCR2^{-/-} consiste de 4 animais. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença significativamente estatística entre o grupo CCR2^{-/-} e o grupo C57BL6, com $p \leq 0,05$ (teste T).

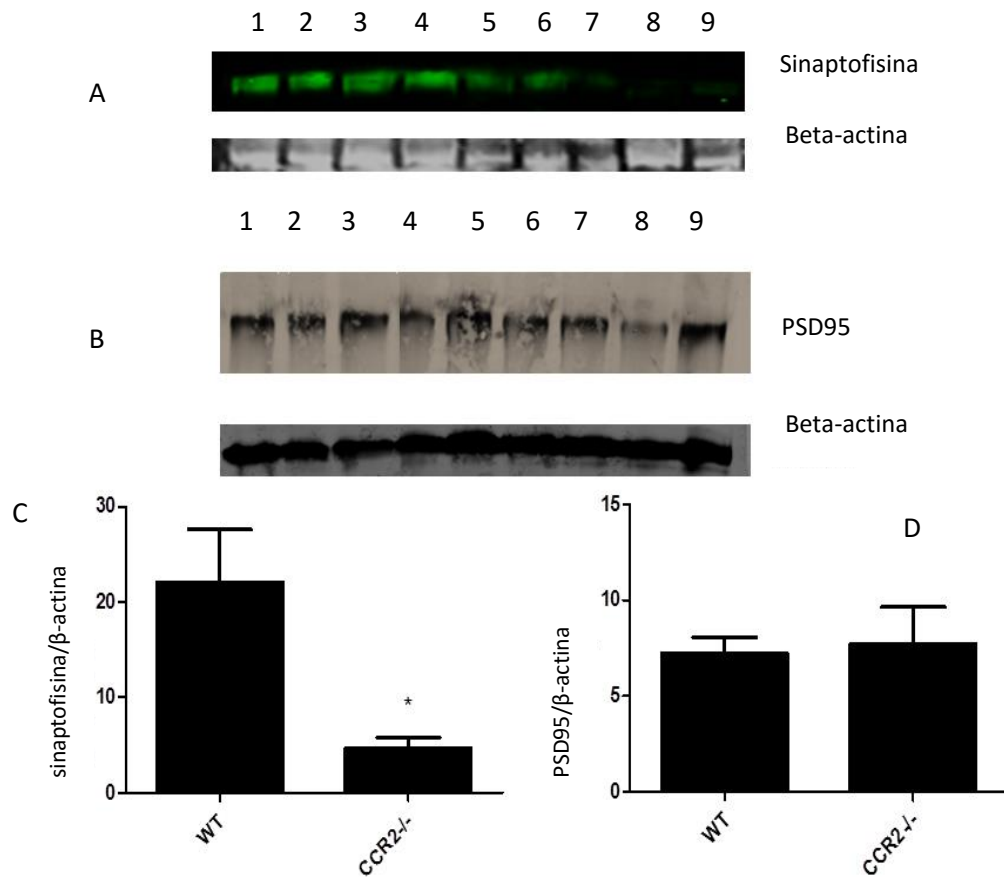


Figura 7.10. Expressão de sinaptofisina e PSD95 no hipocampo de animais CCR2^{-/-} e C57BL6. Animais CCR2^{-/-} e C57BL6 (10 semanas) foram perfundidos com salina. O hipocampo dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foi dissecado e preparado para análise por western blotting. **(A)** Western blotting para análise da expressão da sinaptofisina no hipocampo dos animais C57BL6 e CCR2^{-/-} e a beta-actina que é o controle do carregamento de proteína. Bandas 1, 2, 3 e 4= C57BL6, Bandas 5, 6, 7, 8, 9=CCR2^{-/-}. **(B)** Western blotting para análise da expressão do PSD95 no hipocampo dos animais C57BL6 e CCR2^{-/-} e a beta-actina que é o controle do carregamento de proteína. Bandas 1, 2, 3 e 4= C57BL6, Bandas 5, 6, 7, 8, 9=CCR2^{-/-}. **(C)** Densitometria da sinaptofisina normalizada pela β -actina. **(D)** Densitometria do PSD95 normalizado pela β -actina. **(A)** O grupo C57BL6 consiste de 4 animais, sendo representativo de dois experimentos. O grupo CCR2^{-/-} consiste de 5 animais, sendo representativo de dois experimentos. **(B)** O grupo C57BL6 consiste de 4 animais, sendo representativo de dois experimentos. O grupo CCR2^{-/-} consiste de 5 animais, sendo representativo de dois experimentos. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença significativamente estatística entre o grupo CCR2^{-/-} e o grupo C57BL6, com $p \leq 0,05$ (teste T).

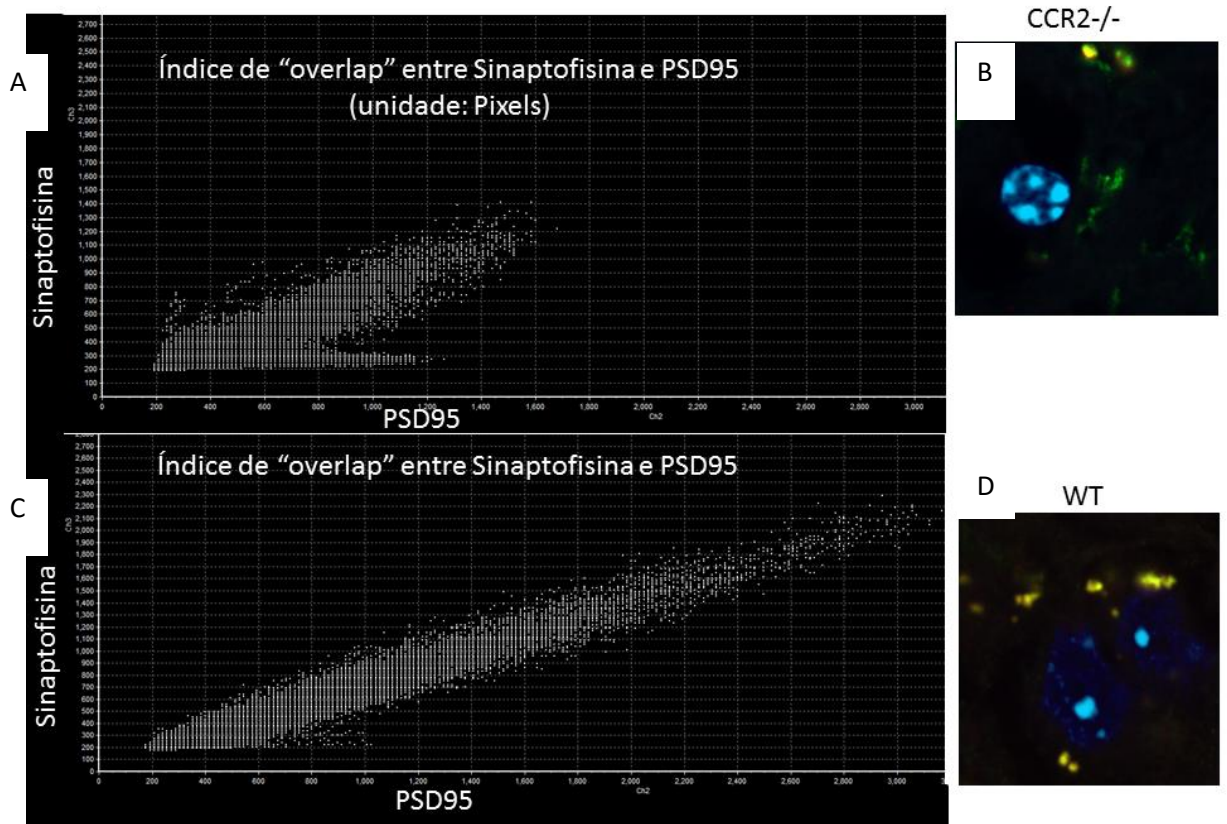


Figura 7.11. Expressão e co-localização entre PSD95 e sinaptofisina no hipocampo de animais CCR2^{-/-} e C57BL6. A expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina e da proteína pós-sináptica PSD95 foi analisada no hipocampo dos animais com 10 semanas de idade através da imunohistoquímica. **(A)** Gráfico representativo do índice de co-localização de sinaptofisina (pixels) e de PSD95 (pixels) no hipocampo do grupo de animais CCR2^{-/-}. **(C)** Gráfico representativo do índice de co-localização de sinaptofisina (pixels) e de PSD95 (pixels) no hipocampo do grupo de animais C57BL6. **(B)** Representa a imunohistoquímica com a expressão de PSD95 (em verde) e da sinaptofisina (em vermelho) no animais CCR2^{-/-}. A co-localização entre a sinaptofisina e o PSD95 possui cor amarela. **(D)** Representa a imunohistoquímica com a expressão de PSD95 (em verde) e da sinaptofisina (em vermelho) no animais C57BL6. A co-localização entre a sinaptofisina e o PSD95 possui cor amarela. Os grupos experimentais consistem de 4 animais.



Como os animais apresentam alteração da memória, resolvemos investigar a deposição de proteína amiloide β no cérebro dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 com 10 semanas de idade por imunohistoquímica (Figuras 7.12 e 7.13). Como podemos observar na figura 7.12, os animais CCR2^{-/-} apresentam aumento da expressão da proteína amiloide β no hipocampo em comparação com os animais C57BL6. Os animais CCR2^{-/-} com 10 semanas de idade (Figura 7.13) também apresentam acúmulo de proteína amiloide β no córtex. El Khoury e cols. (2007) demonstraram que animais geneticamente deficientes para o CCR2 e transgênicos para APP (superexpressam APP), desenvolvem o Alzheimer de forma mais acelerada e possuem mortalidade precoce. Nesse estudo eles observaram que os animais CCR2^{-/-} e transgênicos para APP jovens, acumulavam mais proteína amiloide β 1-42 na região perivascular e esse acúmulo ocorre devido à redução da migração da micróglia para o sistema nervoso central. E esses dados sugerem um possível papel da micróglia na eliminação da proteína amiloide β .

Nosso próximo passo foi avaliar se os camundongos CCR2^{-/-} adultos jovens apresentavam aumento dos níveis de biomarcadores de neuroinflamação no cérebro, através da dosagem dos níveis de citocinas e quimiocinas, da quantificação da expressão de IBA-1 (marcador de micróglia) no hipocampo (Figura 7.14) e no córtex (Figura 7.15) dos animais, bem como da análise da expressão das capases inflamatórias 1 e 12 (Figuras 17 e 18) nos animais C57BL6 e CCR2^{-/-} com 10 semanas de idade, através da imunohistoquímica. Os animais CCR2^{-/-} apresentam a mesma expressão de micróglia quiescente, em comparação com os animais C57BL6 no hipocampo. No córtex existe uma tendência a menor expressão de micróglia quiescente e esse dado também foi observado pelo grupo do El Khoury e cols. (2007). A possível explicação para o acúmulo de proteína amiloide β no cérebro dos animais CCR2^{-/-}, é em decorrência de uma falha na fagocitose e na eliminação da proteína amiloide β no cérebro ou pelo aumento da quantidade de proteína precursora da proteína amiloide β . Para explicar essa hipótese será necessário um ensaio de fagocitose com a micróglia dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6, bem como a análise da expressão da APP no cérebro dos animais. Estes experimentos já estão planejados e serão reportados em publicações subsequentes a esta tese.



Outra análise que nós realizamos foi à quantificação de citocinas e quimiocinas no córtex dos animais e no hipocampo. As citocinas analisadas foram TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10, e as quimiocinas foram o CCL2 e o KC. Como podemos observar na figura 16, os níveis das citocinas se encontram semelhantes nos animais C57BL6 e CCR2 $^{-/-}$. O TNF- α , se encontra aumentado no cérebro de pacientes com Alzheimer e já está bem descrito o seu papel na patogênese do Alzheimer. O TNF- α age em sinergismo com o IFN- γ , aumentando a formação da proteína amiloide β (Blasko e cols., 1999). A IL-1 β também se encontra elevada no cérebro de indivíduos com Alzheimer. A IL-1 β é um potente agente pró-inflamatório, ativando de forma robusta a micróglia e os astrócitos e aumentando a migração de leucócitos periféricos (neutrófilos, células TCD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$, células dendríticas e monócitos) para o tecido cerebral (Shaftel e cols., 2008). Em pacientes com Alzheimer há o aumento da IL-8 e esse aumento se correlaciona com a presença de déficit cognitivo (Alsadany e cols., 2013). O CCL2 também está aumentado em pacientes com Alzheimer, e está correlacionado com aumento do depósito de proteína amiloide β no cérebro e com o declínio precoce da cognição (Galimberti e cols., 2006; Westin e cols., 2012). No entanto, existe um paradoxo em relação ao CCL2. Animais geneticamente deficientes para o CCR2, também acumulam a proteína amiloide beta de forma precoce, o que leva a mortalidade precoce dos camundongos (El Khoury e cols., 2007).

Para que ocorra a maturação da IL-1 β , a pró-IL-1 β é clivada sob a ação da caspase-1. No Alzheimer a caspase-1 é importante para a patogênese. Animais geneticamente deficientes para caspase-1 possuem proteção da perda da memória espacial e aumento da fagocitose e eliminação da proteína amiloide β (Heneka e cols., 2013). Como a caspase-1 tem um papel importante na fisiopatologia do Alzheimer, nós resolvemos analisar a expressão da caspase-1 no hipocampo dos animais CCR2 $^{-/-}$ e C57BL6 (Figura 7.17). No entanto, de forma inesperada, os animais geneticamente deficientes para o CCR2 apresentam redução da expressão da caspase-1 no hipocampo. Algumas alterações genéticas levam a essa redução da expressão da pró-caspase (Heymann e cols., 2014). Outro fator que controla a expressão da caspase-1 é a caspase-12, possuindo um feedback negativo (Scott



and Saleh, 2007). Por isso nós resolvemos analisar a expressão da caspase-12 no hipocampo dos animais, e conforme esperávamos, há um aumento significativo da expressão da caspase-12 clivada no hipocampo dos animais CCR2^{-/-} em comparação com os animais C57BL6 (Figura 7.18). A caspase-12 também inibe a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que é importante para a síntese de várias citocinas. O que poderia explicar porque os animais CCR2^{-/-} não possuem aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas (figura 7.16), conforme é observado no Alzheimer.

Está descrito na literatura que a caspase-12 está envolvida com o estresse de retículo via ativação da caspase-3 e é uma das vias ativadas durante apoptose neuronal no Alzheimer (Hitomi e cols., 2004; Ishige e cols., 2007). Por isso, nós realizamos western blotting do hipocampo dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6, para analisar a expressão da caspase-3. Como resultado preliminar nós observamos que os animais CCR2^{-/-} apresentam aumento da expressão da caspase-3 clivada em comparação com os animais C57BL6 (Figura 7.19). Futuramente iremos averiguar se os animais apresentam aumento do estresse de retículo, bem como faremos o ensaio de TUNEL para verificar a apoptose neuronal.

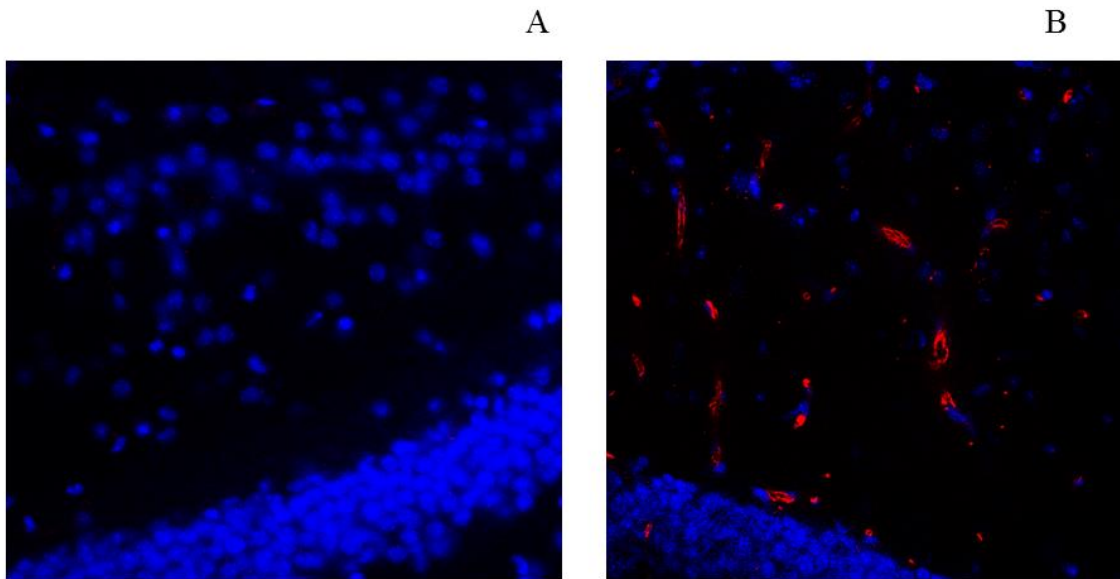


Figura 7.12. Expressão de proteína amiloide β no hipocampo de animais CCR2^{-/-} (B) e C57BL6 (A) com 10 semanas de idade. Os animais C57BL6 (A) e CCR2^{-/-} (B) foram perfundidos com salina, os cérebros dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foram dissecados e preparados para a realização de criocorte. Os cérebros foram fatiados em criostato, com a espessura de 20 micrometros. Realizamos a imunohistoquímica de proteína beta-amiloide (anticorpo anti-proteína amiloide β 1-16 /E-10 da marca covance) no cérebro dos animais (Marcação em vermelho) e o núcleo foi marcado com DAPI. As lâminas contendo os cérebros foram analisadas em microscópio confocal utilizando aumento de 60 vezes. (A) Imunohistoquímica representativa de beta-amiloide no hipocampo de animais C57BL6. (B) Imunohistoquímica representativa da expressão de beta-amiloide no hipocampo de animais CCR2^{-/-}. A imagem é representativa de dois experimentos, sendo que os grupos experimentais consistiram de 3 animais por grupo.

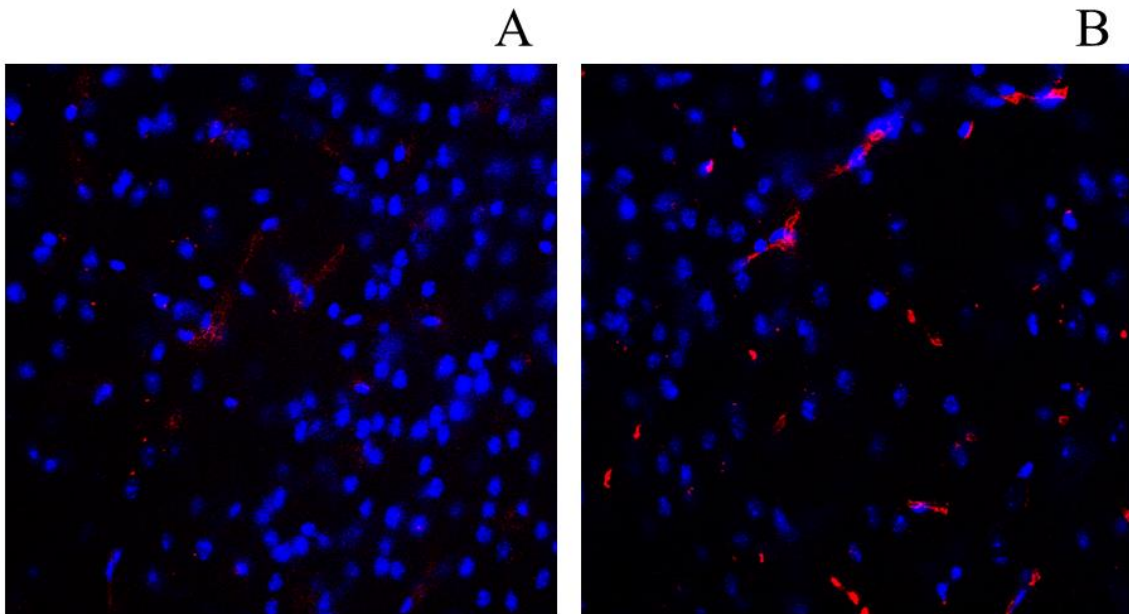


Figura 7.13. Expressão de proteína amiloide β no córtex cerebral dos animais CCR2^{-/-} (B) e C57BL6 (A) com 10 semanas de idade. Os animais C57BL6 (A) e CCR2^{-/-} (B) foram perfundidos com salina, os cérebros dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foram dissecados e preparados para a realização de criocorte. Os cérebros foram fatiados em criostato, com a espessura de 20 micrometros. Realizamos a imunohistoquímica de proteína beta-amilóide no cérebro dos animais (Marcação em vermelho) e o núcleo foi marcado com DAPI. As lâminas contendo os cérebros foram analisadas em microscópio confocal. (A) Imunohistoquímica representativa de beta-amilóide no cortex de animais C57BL6. (B) Imunohistoquímica representativa da expressão de beta-amilóide no cortex de animais CCR2^{-/-}. A imagem é representativa de dois experimentos, sendo que os grupos experimentais consistiram de 3 animais por grupo.

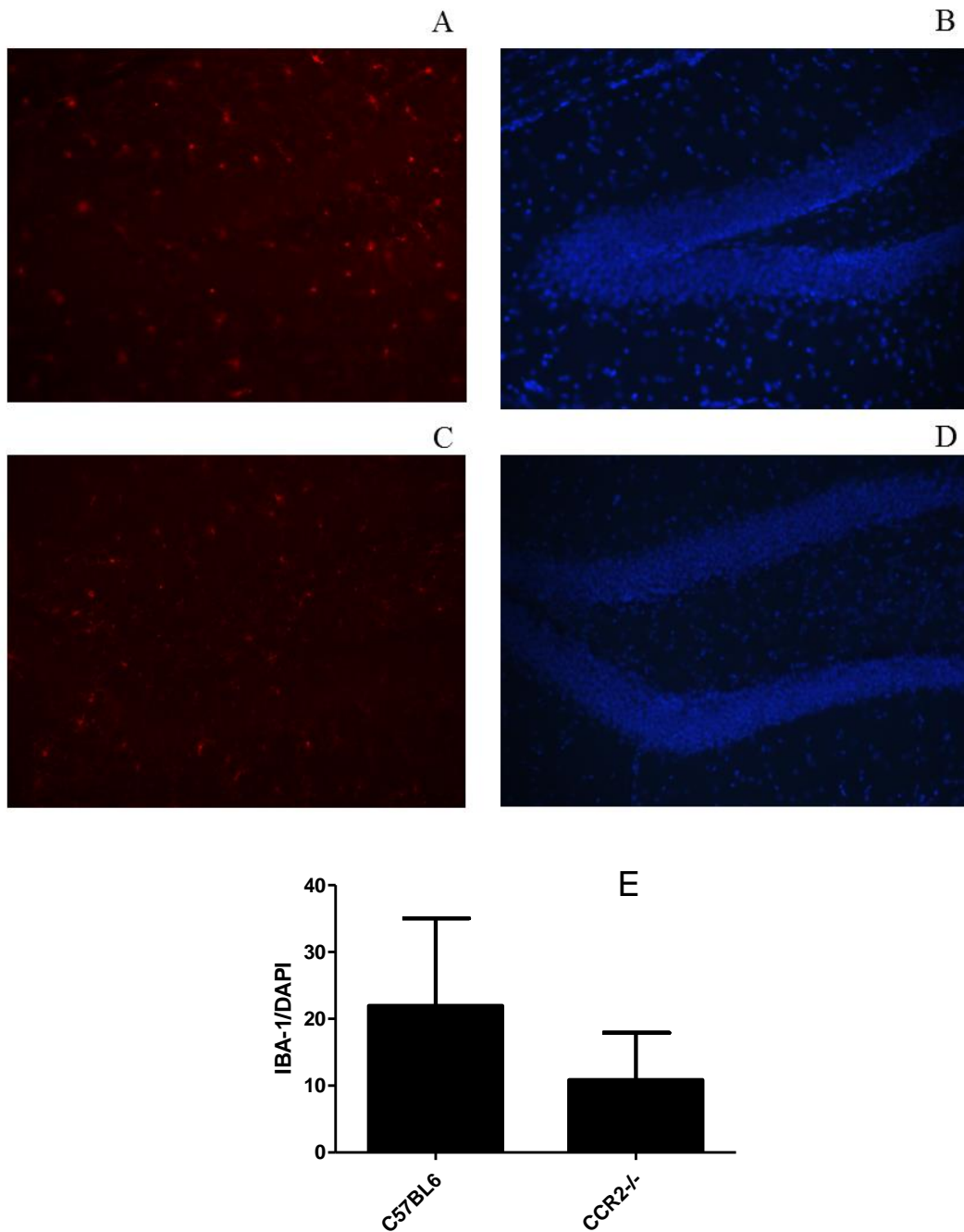


Figura 7.14. Expressão de IBA-1 (microglia) no hipocampo de animais CCR2^{-/-} (C) e C57BL6 (A). Os animais C57BL6 (A) e CCR2^{-/-} (C) com 10 semanas, foram perfundidos com salina. Os cérebros dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foram dissecados e preparados para a realização de criocorte. Os cérebros foram fatiados em criostato, com a espessura de 20 micrometros. Realizamos a imunohistoquímica de IBA-1 (Microglia) no cérebro dos animais. As lâminas contendo os cérebros foram analisadas em microscópio de fluorescência no aumento de 40 vezes. (A) Imunohistoquímica representativa de IBA-1 no hipocampo de animais C57BL6. (B) Marcação de núcleo com DAPI no hipocampo de animais C57BL6. (C) Imunohistoquímica representativa de IBA-1 no hipocampo de animais CCR2^{-/-}. (D) Marcação de núcleo com DAPI no hipocampo de animais CCR2^{-/-}. (E) Quantidade de células marcadas com IBA-1 normalizada pelo DAPI. Os grupos experimentais consistem de 3 animais. (E) O resultado representa a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média).

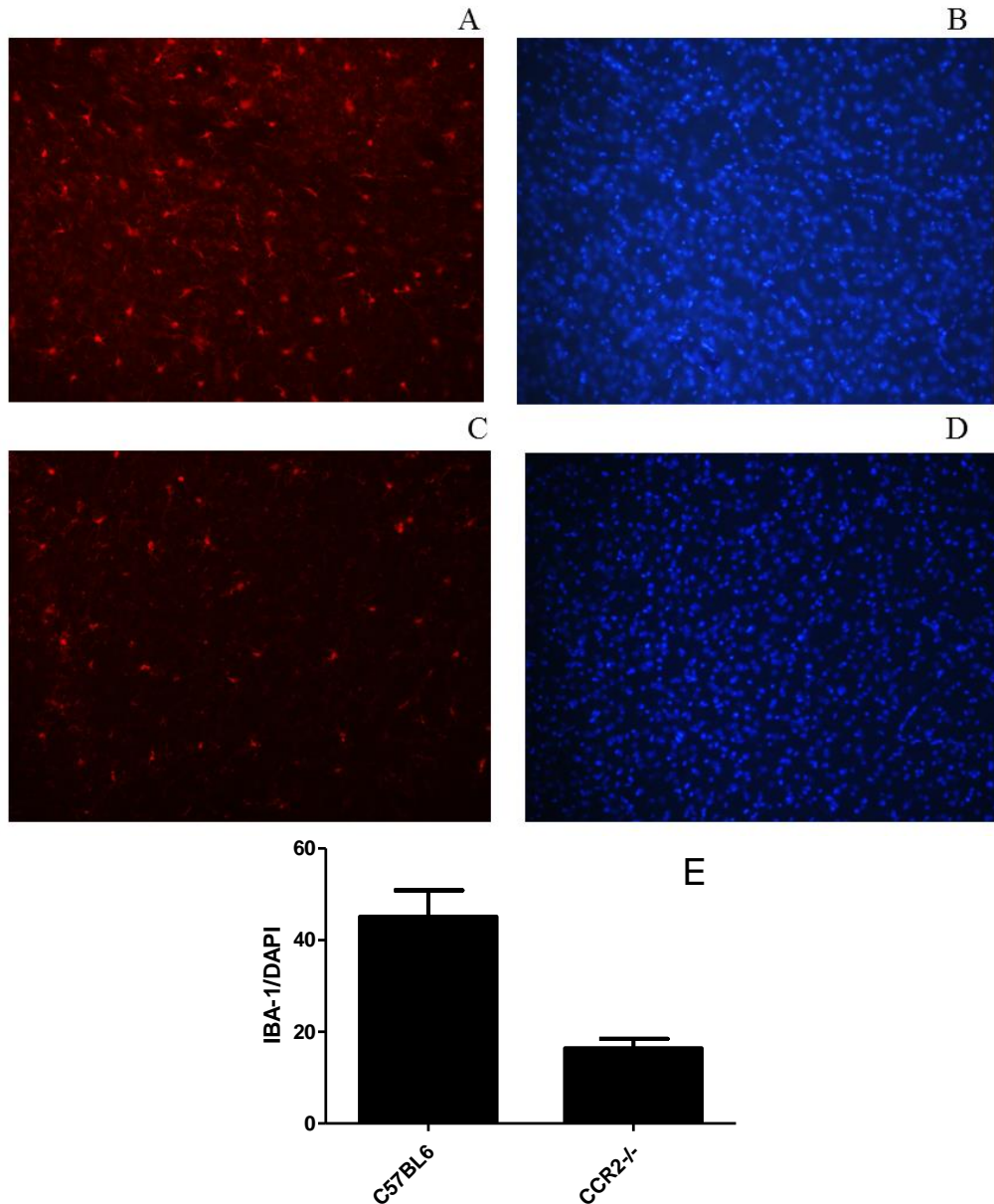


Figura 7.15. Expressão de IBA-1 (micróglia) no córtex de animais CCR2^{-/-} (C) e C57BL6 (A). Os animais C57BL6 (A) e CCR2^{-/-} (C) com 10 semanas foram perfundidos com salina. Os cérebros dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foram dissecados e preparados para a realização de criocorte. Os cérebros foram fatiados em criostato, com a espessura de 20 micrometros. Realizamos a imunohistoquímica de IBA-1 (Microglia- marcação em vermelho) no cérebro dos animais. As lâminas contendo os cérebros foram analisadas em microscópio de fluorescência no aumento de 40 vezes. (A) Imunohistoquímica representativa de IBA-1 no córtex de animais C57BL6. (B) Marcação de núcleo com DAPI no córtex de animais C57BL6 (C) Imunohistoquímica representativa de IBA-1 no córtex de animais CCR2^{-/-}. (D) Marcação de núcleo com DAPI no córtex de animais CCR2 (E) Quantidade de células marcadas com IBA-1 normalizada pelo DAPI. Os grupos experimentais consistem de 3 animais. (E) O resultado representa a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média).

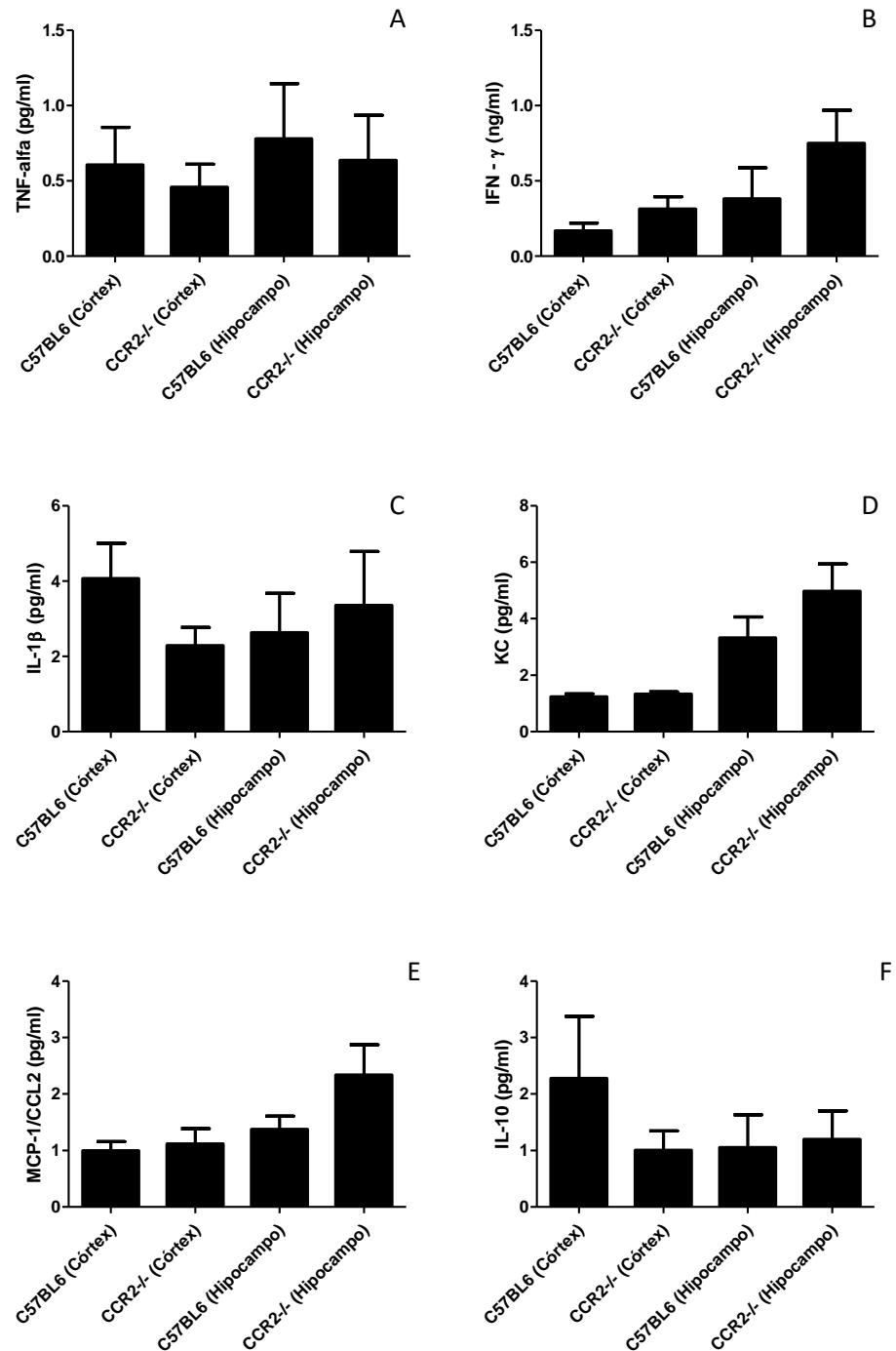


Figura 7.16. Nível de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-10) e quimiocinas (CCL2 e IL-10) no cérebro total e no hipocampo de animais CCR2-/- e C57BL/6 com 10 semanas de idade. Os animais C57BL/6 e CCR2-/- com 10 semanas de idade, foram perfundidos com salina. O cérebro dos animais CCR2-/- e C57BL/6 foi dissecado e preparado para a realização da quantificação de citocinas por ELISA. As citocinas analisadas foram TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-1 β (C), KC (D), MCP-1 (E) e IL-10 (F). Os grupos experimentais consistem de 6 animais. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média).

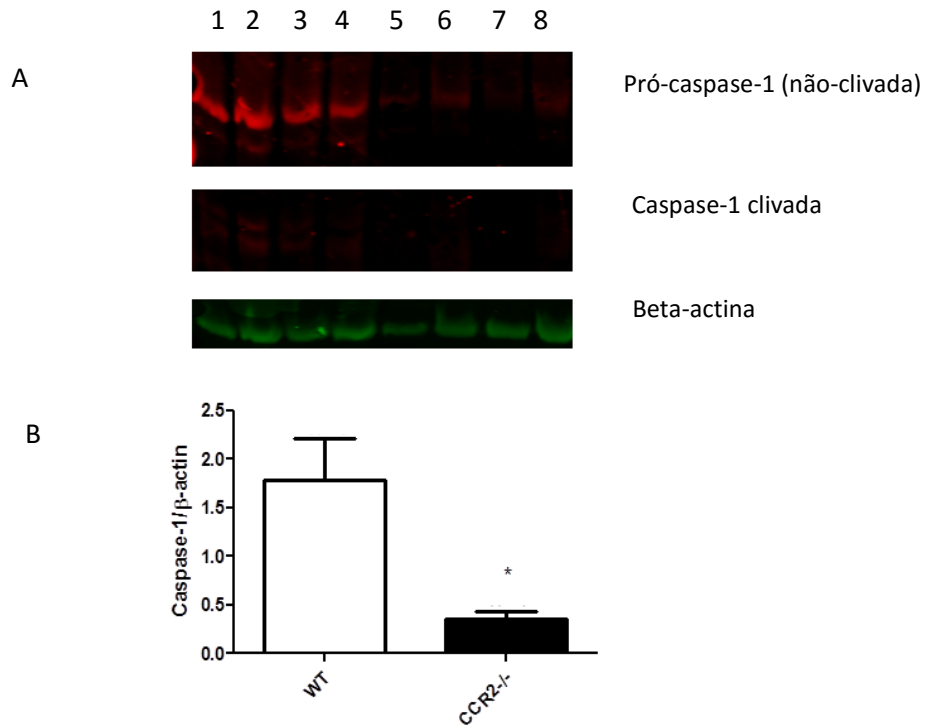


Figura 7.17. Expressão de pro-caspase-1 e da caspase-1 clivada no hipocampo de animais CCR2^{-/-} e C57BL6. O hipocampo dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foi dissecado a partir do cérebro perfundidos com salina, e preparado para análise por western blotting. **(A)** Western blotting da análise da expressão da caspase-1 clivada e da caspase-1 não clivada no hipocampo dos animais naïve C57BL6 e CCR2^{-/-} e a beta-actina que é o controle do carregamento de proteína. Bandas 1, 2, 3 e 4= C57BL6, Bandas 5, 6, 7, 8=CCR2^{-/-}. **(B)** Densitometria das bandas da caspase-1 não clivada pela beta-actina. Os grupos experimentais consistem de 4 animais. Os resultados representam a média ± E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença significativamente estatística entre o grupo CCR2^{-/-} e o grupo C57BL6, com $p \leq 0,05$ (teste T).

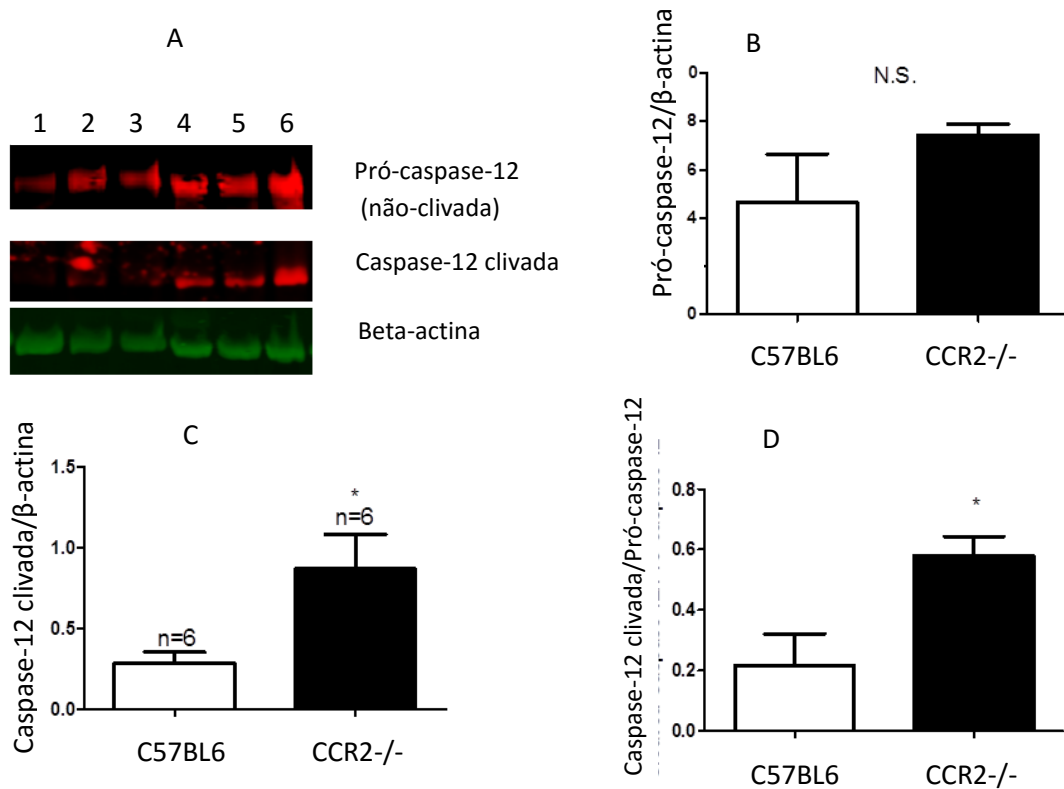


Figura 7.18. Expressão de pro-caspase-12 e da caspase-12 clivada no hipocampo de animais CCR2-/- e C57BL6. O hipocampo dos animais CCR2-/- e C57BL6 foi dissecado a partir do cérebro perfundido com salina, e preparado para análise por western blotting. **(A)** Western blotting para análise da expressão da caspase-12 clivada e da caspase-12 não clivada no hipocampo dos animais naïve C57BL6 e CCR2-/- e a beta-actina que é o controle do carregamento de proteína. Bandas 1, 2, 3= C57BL6, Bandas 5, 6, 7=CCR2-/- **(B)** Densitometria da Pró-caspase-12 normalizada pela beta-actina **(C)** Densitometria da caspase-12 clivada normalizada pela beta-actina **(D)** Densitometria da caspase-12 clivada normalizada pela pró-caspase. Os grupos experimentais consistem de 3 animais. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença significativamente estatística entre o grupo CCR2-/- e o grupo C57BL6, com $p \leq 0,05$ (teste T).



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

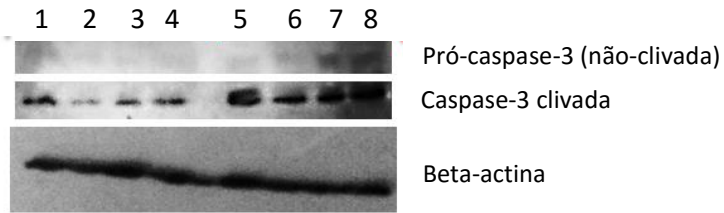


Figura 7.19. Expressão de pro-caspase-3 e da caspase-3 clivada no hipocampo de animais CCR2^{-/-} e C57BL6. O hipocampo dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foi dissecado a partir do cérebro perfundido com salina, e preparado para análise por western blotting. Western blotting para análise da expressão da caspase-3 e da caspase-3 não clivada no hipocampo dos animais C57BL6 e CCR2^{-/-} e a beta-actina que é o controle do carregamento de proteína. Bandas 1, 2, 3,4= C57BL6, Bandas 5, 6, 7,8=CCR2^{-/-}. Os grupos experimentais consistem de 4 animais.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Além da ativação das caspases 12 e 3, outro fator que aumenta a morte neuronal no Alzheimer, é a hiperativação do receptor NMDA, através do aumento dos níveis de glutamato. Em pacientes com Alzheimer o glutamato tem um papel importante, uma vez que ele aumenta a excitabilidade do receptor NMDA, que culmina com a neurotoxicidade e a morte neuronal (Gordon-Krajcer e cols., 2002; Greenamyre and Young, 1989). A enzima glutamina sintetase converte o glutamato em glutamina, na glia. A glutamina é então liberada. Quando a glutamina entra no neurônio ela é convertida em glutamato pela enzima glutaminase mitocondrial (Butterfield and Pocernich, 2003).

Nós avaliamos os níveis de glutamato e glutamina no hipocampo dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 (Figura 7.20). Obtivemos como resultado preliminar que há um aumento significativo dos níveis de glutamina nos animais CCR2^{-/-} (n=3), em comparação com os animais C57BL6. No entanto, os níveis de glutamato são similares entre os grupos C57BL6 e CCR2^{-/-}, onde apenas um animal do grupo CCR2^{-/-} apresentou aumento dos níveis de glutamato. Por isso, esse dado do glutamato ainda é inconclusivo, sendo necessário, aumentar o número de animais em cada grupo.

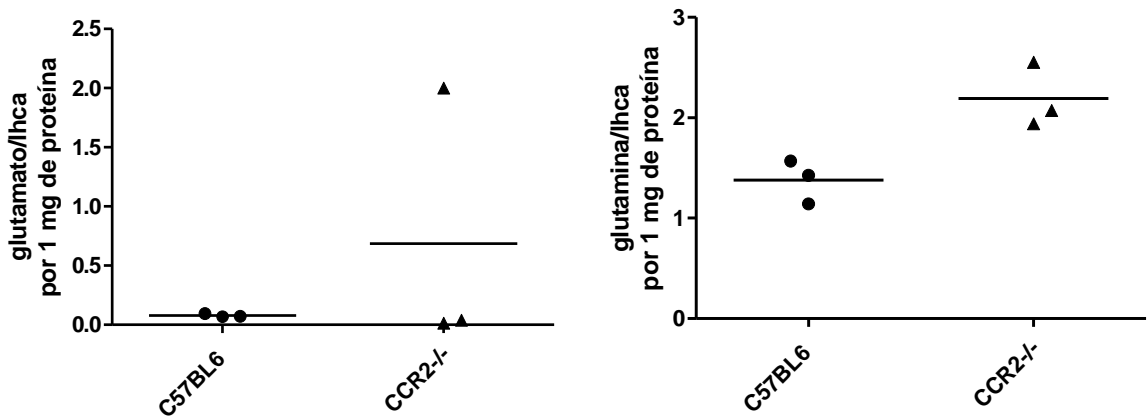


Figura 7.20. Nível de glutamato e glutamina no hipocampo de animais CCR2^{-/-} e C57BL/6 com 10 semanas de idade. Os animais C57BL/6 e CCR2^{-/-} com 10 semanas de idade, foram perfundidos com salina. Os cérebros dos animais CCR2^{-/-} e C57BL/6 foram removidos, e o hipocampus foram dissecados, macerados com solução RIPA e homogeneizados com 5% de TCA (ácido tricloroacético), sendo centrifugado a 18000g a 4°C por 30 minutos. Posteriormente a amostra foi lavada 3 vezes com água saturada dietil Ester para remover o TCA. Realizamos a quantificação dos níveis de glutamato e glutamina no hipocampo através da cromatografia líquida de alta performance (HsPCL). Os grupos experimentais consistem de 3 animais. Os símbolos representam os animais e a barra a média dos níveis do glutamato ou glutamina.



Como os animais CCR2^{-/-} jovens (com 10 semanas de idade), apresentaram prejuízo cognitivo, resolvemos averiguar se em animais idosos (com um ano e meio de idade), a cognição estaria mais prejudicada. Inicialmente realizamos a natação forçada dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 com um ano e meio de idade (Idoso), por 3 dias consecutivos. Os animais permaneceram por 1 minuto na piscina e fizemos a contagem do tempo de latência dos animais para encontrar a plataforma.

Os animais C57BL6 com um ano e meio de idade (Figura 7.21) aprenderam no segundo dia da natação forçada com tempo de latência no terceiro dia aproximado de 20 segundos em ambos os grupos. Os animais CCR2^{-/-} idosos (Figura 7.21), não aprendem no terceiro dia da natação forçada, com tempo de latência em torno de 35 segundos. Sugerindo que a presença do comprometimento da memória dos animais jovens CCR2^{-/-} persiste nos animais idosos CCR2^{-/-}.

Na esquiwa passiva de um treino (Figura 7.22), o prejuízo da memória de curto prazo e de longo prazo foi mais proeminente nos animais CCR2^{-/-} idosos (tempo de latência em torno de 17 segundos), que nos animais CCR2^{-/-} jovens (10 semanas de idade - tempo de latência em torno de 90 segundos). Os animais C57BL6 idosos, não possuem comprometimento da memória de longo prazo e da memória de curto prazo.

Quanto aos animais CCR2^{-/-} com 10 semanas de idade (Figura 7.6), nós observamos que estes precisaram de 8 treinos para aprender, enquanto que os animais C57BL6 precisaram de cerca de 4 treinos para aprender. E após esses 8 treinos os animais CCR2^{-/-} apresentam a memória de curto prazo e a memória de longo prazo preservadas, da mesma forma que os animais C57BL6. No entanto, o decaimento da memória ocorre de forma mais rápida nos animais CCR2^{-/-} com 10 semanas de idade do que nos animais C57BL6. Quando realizamos a curva de aprendizado nos animais CCR2^{-/-} idosos (Figura 7.23), observamos que eles precisam de cerca de 8 treinos para aprender, e os animais C57BL6 idosos precisam de 4 treinos para aprender, não havendo alteração na curva de aprendizado, entre os animais jovens e idosos. Observamos também o decaimento maior da memória nos animais CCR2^{-/-}, em comparação com os animais C57BL6. Esses dados



sugerem que os animais CCR2^{-/-} independente da idade precisam de mais treinos para aprender e depois que aprendem conseguem formar as memórias de curto e de longo prazo. No entanto, a memória não é sustentada por longos períodos tanto nos animais jovens quanto nos animais idosos.

E essa alteração do comportamento pode ser explicada pelo acúmulo de proteína amiloide β no hipocampo dos animais CCR2^{-/-}, uma vez que os animais CCR2^{-/-} idosos, também apresentam acúmulo da proteína amiloide β no córtex (Figura 7.24) e no hipocampo (Figura 7.25), na região perivascular, da mesma forma que foi observada nos animais CCR2^{-/-} jovens. No entanto, os animais C57BL6 idosos, não apresentam aumento da expressão da proteína amiloide β no hipocampo e no córtex, sugerindo que a ausência do CCR2 tem papel fundamental o acúmulo da proteína amiloide β no hipocampo e no córtex.

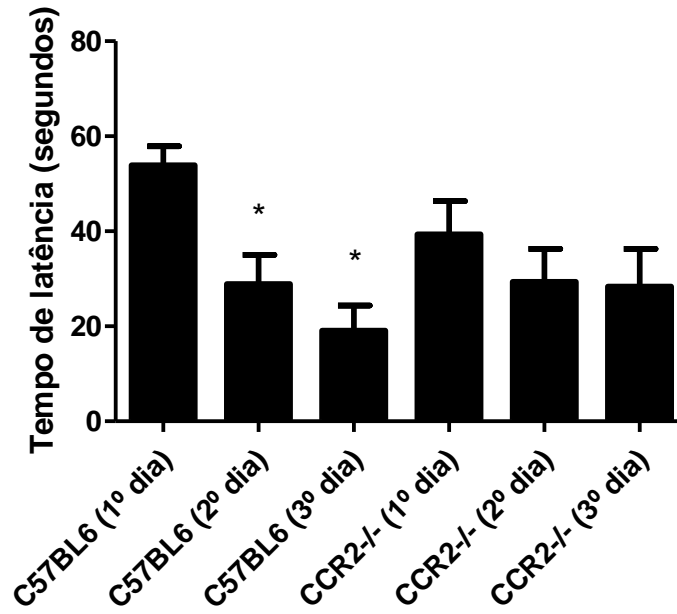


Figura 7.21. Curva de aprendizado dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 idosos na natação forçada. Os animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foram submetidos a natação forçada por 3 dias consecutivos (com tempo de teste de 1 minuto). Realizamos a análise do tempo de latência nos três dias, e os dados foram plotados em forma de curva de aprendizado. Na natação forçada os animais foram colocados dentro da piscina por um minuto e nós contamos o tempo que os animais demoravam a encontrar a plataforma submersa na piscina (latência). Os animais C57BL6 idosos aprendem no segundo dia do teste, com redução significativa do tempo de latência em relação ao primeiro dia do teste do grupo C57BL6. Já os animais CCR2^{-/-} não aprendem no terceiro dia, onde o tempo de latência não foi diferente estatisticamente em relação ao primeiro dia do grupo de animais CCR2^{-/-}. O grupo C57BL6 consiste de 7 animais, sendo representativo de dois experimentos. O grupo CCR2^{-/-} consiste de 10 animais, sendo representativo de dois experimentos. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença significativamente estatística entre o grupo C57BL6 (no 2º dia ou 3º dia) em comparação com o grupo C57BL6 (1º dia), com $p \leq 0,05$.

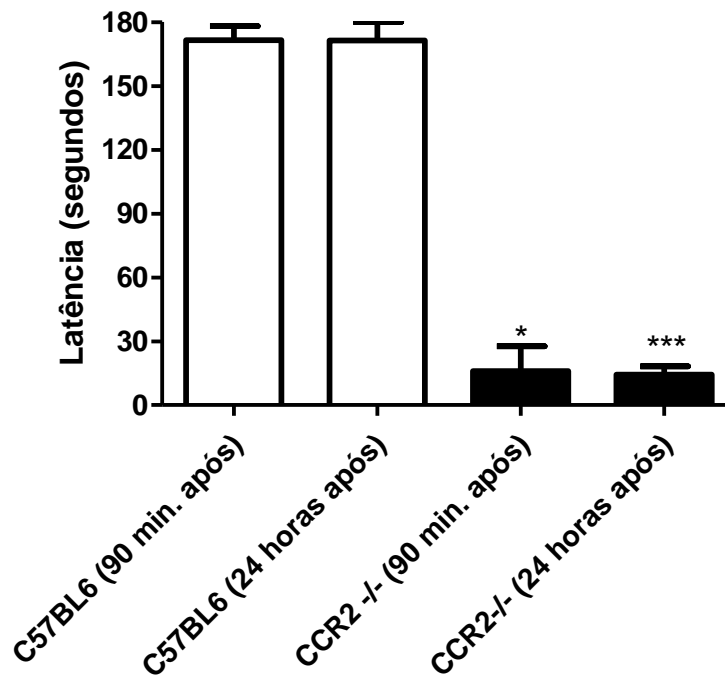


Figura 7.22. Tempo de Latência a plataforma dos animais CCR2-/- e C57BL6 idosos na esquiwa passiva. Os animais CCR2-/- e C57BL6 foram submetidos à esquiwa passiva com um treino. Na esquiwa nós colocamos os animais na caixa da esquiwa, por 180 segundos e contamos o tempo que os animais permaneceram na plataforma segura (tempo de latência). Realizamos o treinamento dos animais até que eles permanecessem por 180 segundos na plataforma. Uma hora e meia, contadas a partir do último treino de cada animal avaliamos a memória de curto prazo, colocando o animal novamente na caixa da esquiwa e 24 horas após o último treino para avaliar a memória de longo prazo. O grupo C57BL6 consiste de 7 animais, sendo representativo de dois experimentos. O grupo CCR2-/- consiste de 10 animais, sendo representativo de dois experimentos. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença significativamente estatística entre o grupo CCR2-/- (90 min. após) e o grupo C57BL6 (90 min. após), com $p \leq 0,05$ (teste one way anova). Os asterísticos (***) representam diferença significativa entre o grupo CCR2-/- (24 horas após) e o grupo C57BL6 (24 horas após), com $p \leq 0,05$ (teste one way anova).

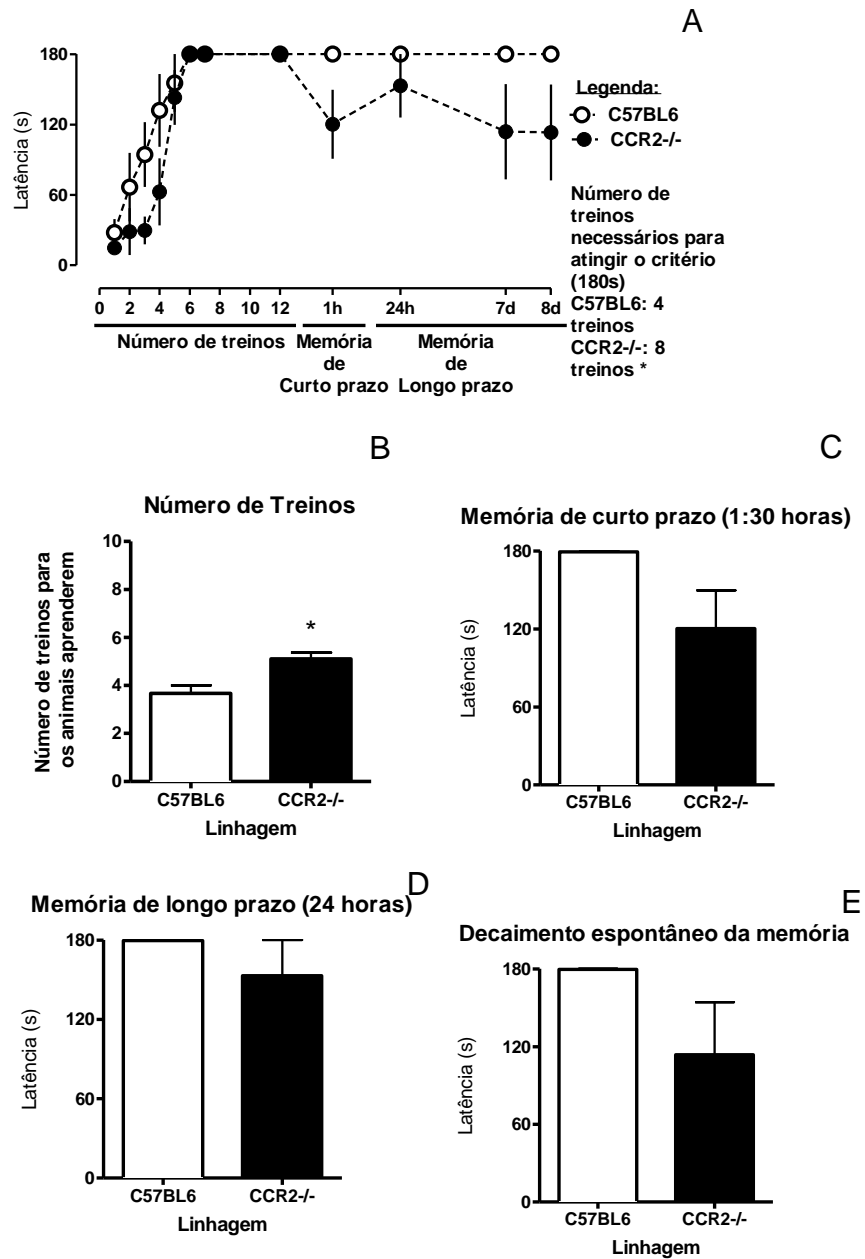


Figura 7.23. Curva de aprendizado dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 idosos na esquiwa inibitória. Os animais CCR2^{-/-} e C57BL6 com um ano de meio de idade foram submetidos à esquiwa de múltiplos treinos. Na esquiwa nós colocamos os animais na caixa da esquiwa, por 180 segundos e contamos o tempo que os animais permaneceram na plataforma segura (tempo de latência). Realizamos o treinamento dos animais até que eles permanecessem por 180 segundos na plataforma. Uma hora e meia contadas a partir do último treino de cada animal avaliamos a memória de curto prazo, colocando o animal novamente na caixa da esquiwa e 24 horas após o último treino para avaliar a memória de longo prazo. Sete dias após o treino, realizamos novamente a esquiwa passiva, para verificar o decaimento da memória. **(A e B)** Os animais CCR2^{-/-} precisam de mais treinos para aprender, cerca de 8 treinos, em comparação com os C57BL6, que necessitam de cerca de 4 treinos para aprender. Após os múltiplos treinos na esquiwa, os animais CCR2^{-/-} conseguem formar a memória de longo prazo **(A e C)** e de curto prazo **(A e D)**, de forma similar aos animais C57BL6. **(A e E)** E as duas linhagens, C57BL6 e CCR2^{-/-}, não possuem decaimento da memória, 7 e 8 dias após a esquiwa. Os grupos experimentais consistem de 7 animais, sendo representativo de dois experimentos. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença significativamente estatística entre o grupo CCR2^{-/-} e o grupo C57BL6, com $p \leq 0,05$ (teste T).

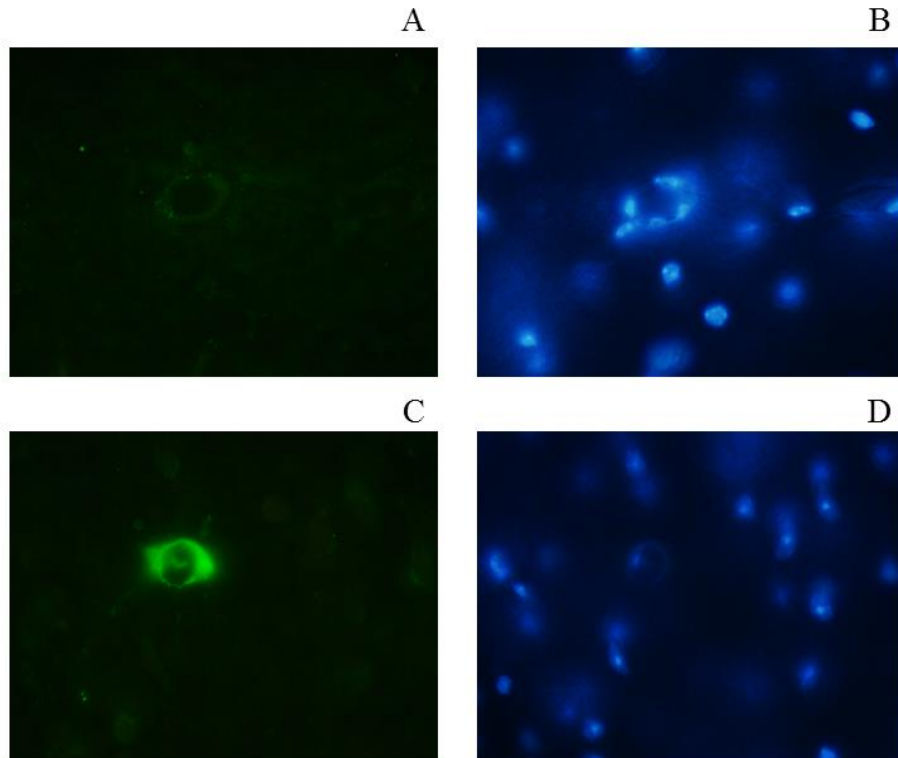


Figura 7.24. Expressão de proteína amiloide β no córtex cerebral de animais CCR2^{-/-} (C) e C57BL6 (A) idosos. Os animais C57BL6 (A) e CCR2^{-/-} (C) com um ano e meio de idade, foram perfundidos com salina. O cérebro dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foi dissecado e preparado para a realização de criocorte. Os cérebros foram fatiados em criostato, com a espessura de 20 micrometros. Realizamos a imunohistoquímica da proteína beta-amilóide no cérebro dos animais. As lâminas contendo os cérebros foram analisadas em microscópio de fluorescência. (A) Imunohistoquímica representativa de beta-amilóide no córtex de animais C57BL6. (B) Marcação de núcleo com DAPI no córtex de animais C57BL6. (C) Imunohistoquímica representativa da expressão de beta-amilóide no córtex de animais CCR2^{-/-} naïve. (D) Marcação de núcleo com DAPI no córtex de animais CCR2^{-/-}. As imagens são representativas de um animal por grupo experimental.

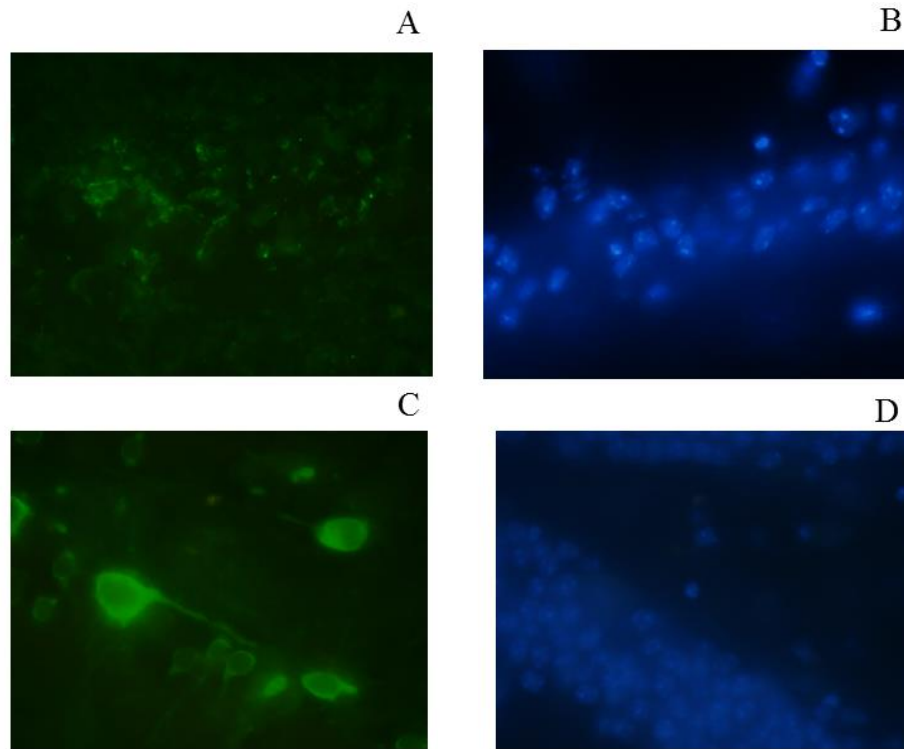


Figura 7.25. Expressão de proteína amiloide β no hipocampo de animais CCR2^{-/-} (C) e C57BL6 (A) idosos. Os animais C57BL6 (A) e CCR2^{-/-} (C) com um ano e meio de idade, foram perfundidos com salina. O cérebro dos animais CCR2^{-/-} e C57BL6 foi dissecado e preparado para a realização de criocorte. Os cérebros foram fatiados em criostato, com a espessura de 20 micrometros. Realizamos a imunohistoquímica da proteína beta-amilóide no cérebro dos animais. As lâminas contendo os cérebros foram analisadas em microscópio de fluorescência. (A) Imunohistoquímica representativa de beta-amilóide no hipocampo de animais C57BL6. (B) Marcação de núcleo com DAPI no hipocampo de animais C57BL6. (C) Imunohistoquímica representativa da expressão de beta-amilóide no hipocampo de animais CCR2^{-/-}. (D) Marcação de núcleo com DAPI no hipocampo de animais CCR2^{-/-} naïve. As imagens são representativas de um animal por grupo experimental.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Como a proteína amiloide β se acumula ao redor dos vasos (El Khoury e cols., 2007) e existem vários dados na literatura que comprovam que a proteína amiloide β acumulada ao redor dos vasos leva a angiopatia (Miao e cols., 2005), nós resolvemos analisar a perfusão cerebral, o rolamento e adesão de leucócitos nos vasos (Figura 7.26). Como podemos observar na figura 7.16, os animais C57BL6 e CCR2^{-/-} apresentam perfusão cerebral, densidade capilar cerebral, rolamento e adesão de leucócitos nos vasos cerebrais semelhantes. No entanto, os animais idosos apresentam redução significativa da perfusão cerebral e da densidade capilar, e um aumento do rolamento de leucócitos nos vasos do cérebro. Esse aumento do rolamento de leucócitos pode ser justificado pela redução da perfusão tecidual, com redução da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e consequente maior rolamento de células no endotélio vascular. Em pacientes com Alzheimer que apresentam quadro de déficit cognitivo, ocorre a vasculite amiloideana, acompanhada de hemorragia cerebral e os pacientes apresentam também áreas isquêmicas no cérebro. Futuramente iremos analisar a barreira hematoencefálica dos animais CCR2^{-/-} e a analisar se ocorre a presença de áreas hemorrágicas no cérebro dos animais.

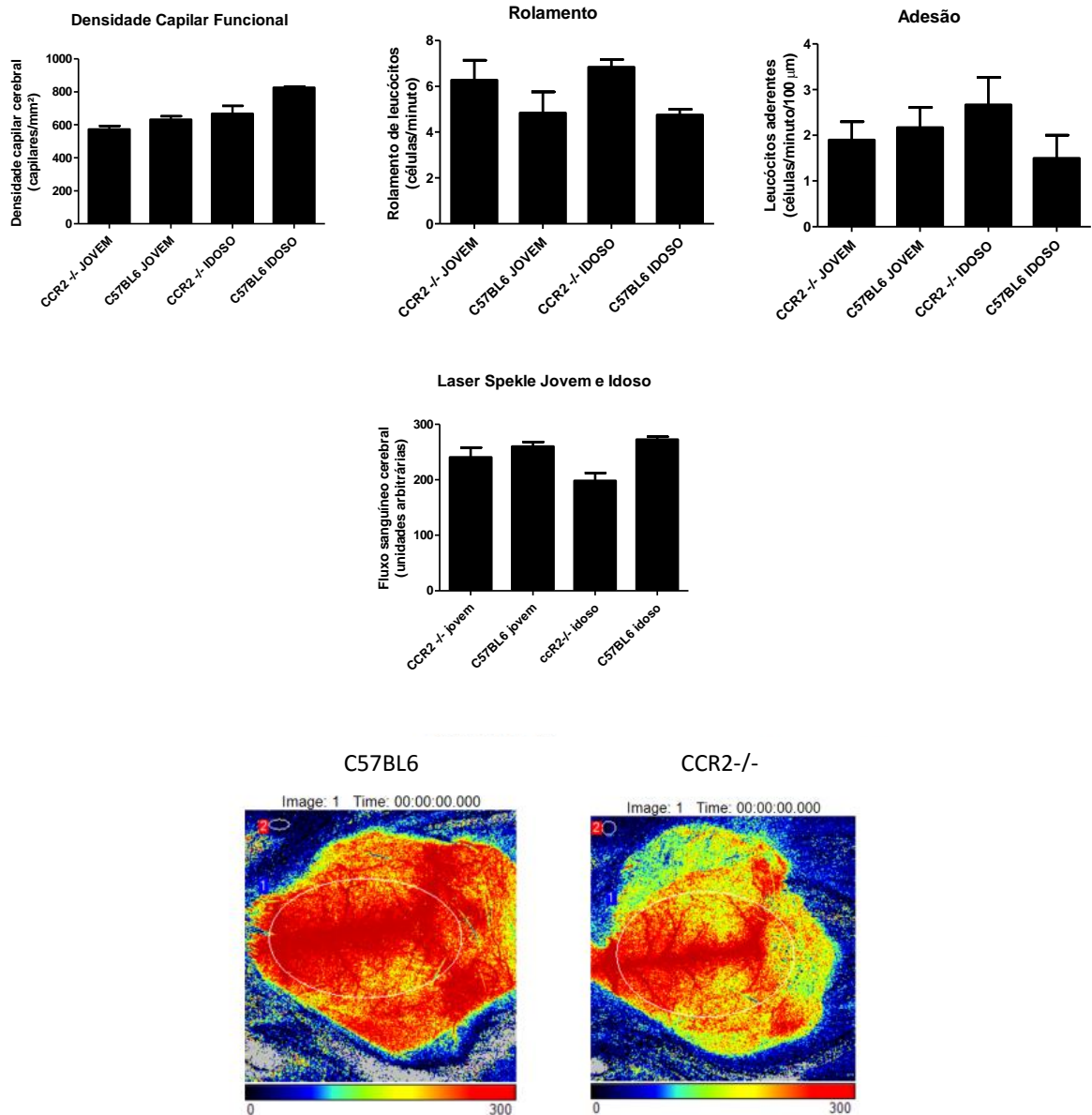


Figura 7.26. Perfusão cerebral do animais CCR2-/- e C57BL6. Os animais C57BL6 e CCR2-/- com 10 semanas e um ano e meio de idade tiveram sua perfusão cerebral avaliada, o rolamento e adesão de leucócitos nos vasos cerebrais quantificada e a densidade capilar verificada. N= 3 animais no grupo C57BL6 jovem, CCR2-/- jovem e CCR2-/- idoso e 2 animais no grupo C57BL6 idoso. Os grupos experimentais CCR2-/- (jovem e idoso) e C57BL6 (jovem) consistem de 3 animais. O grupo experimental C57BL6 idoso consiste de 2 animais. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (Erro padrão da média). O asterístico (*) representa diferença significativamente estatística entre o grupo CCR2-/- e o grupo C57BL6, com $p \leq 0,05$ (teste T).



8. Conclusão

Nossos resultados sugerem que o CCR2 é importante para o processo de cognição, estando envolvido com o aprendizado e com a formação das memórias de curto prazo e de longo prazo, das memórias contextuais e aversivas. O CCR2 é importante para o processo de eliminação da proteína amiloide β . Como a proteína amiloide β se acumula na região perivascular, os animais geneticamente deficientes para o CCR2 apresentam alteração da perfusão sanguínea, aumento do rolamento de leucócitos na parede dos vasos ao longo do envelhecimento. No entanto, esses leucócitos não migram para o tecido cerebral. Mais investigações são necessárias para identificar o papel do CCR2 no Alzheimer, analisar se o CCR2 é importante para a eliminação da proteína amiloide β via ativação e atração de micróglia. Futuramente também iremos tratar os animais com amantina e verificar como fica a cognição dos animais. Além disso, para investigar o papel do CCR2 no processo de consolidação de memória, iremos tratar animais com o antagonista do CCR2 antes de realizar o ensaio de comportamento, tanto na esQUIVA passiva quanto na nataÇÃO forçada.

A compreensão do papel fisiológico do CCR2 no sistema nervoso central é fundamental, uma vez que existem poucos dados na literatura falando sobre o papel das quimiocinas no processo de consolidação de memória e aprendizado, bem como seu papel na liberação de neurotransmissores, envolvidos com a consolidação de memória. Além disso, futuramente avaliaremos se os animais CCR2^{-/-} poderão ser utilizados como modelo de estudo para o Alzheimer, uma vez que os animais apresentam acúmulo de proteína beta amiloide no cérebro, acompanhada de déficit de aprendizado, que são características do Alzheimer.



9. Referências bibliográficas

- Abend R, A Karni, A Sadeh, NA Fox, DS Pine, and Y Bar-Haim. Learning to attend to threat accelerates and enhances memory consolidation. *PLoS One* 2013.8:e62501.
- Allinson TM, ET Parkin, AJ Turner, and NM Hooper. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 2003.74:342-52.
- Alonso M, JH Medina, and L Pozzo-Miller. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem* 2004.11:172-8.
- Alsadany MA, HH Shehata, MI Mohamad, and RG Mahfouz. Histone deacetylases enzyme, copper, and IL-8 levels in patients with Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2013.28:54-61.
- Araujo CV, V Estado, E Tibirica, PT Bozza, HC Castro-Faria-Neto, and AR Silva. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvasc Res* 2012.84:218-21.
- Ashutosh, W Kou, R Cotter, K Borgmann, L Wu, R Persidsky, N Sakhuja, and A Ghorpade. CXCL8 protects human neurons from amyloid-beta-induced neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2011.412:565-71.
- Avital A, I Goshen, A Kamsler, M Segal, K Iverfeldt, G Richter-Levin, and R Yirmiya. Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus* 2003.13:826-34.
- Bahmanyar S, GA Higgins, D Goldgaber, DA Lewis, JH Morrison, MC Wilson, SK Shankar, and DC Gajdusek. Localization of amyloid beta protein messenger RNA in brains from patients with Alzheimer's disease. *Science* 1987.237:77-80.
- Bamji SX, B Rico, N Kimes, and LF Reichardt. BDNF mobilizes synaptic vesicles and enhances synapse formation by disrupting cadherin-beta-catenin interactions. *J Cell Biol* 2006.174:289-99.
- Banisadr G, RD Gosselin, P Mechighel, P Kitabgi, W Rostene, and SM Parsadaniantz. Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: evidence for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides. *J Comp Neurol* 2005a.489:275-92.
- Banisadr G, RD Gosselin, P Mechighel, W Rostene, P Kitabgi, and S Melik Parsadaniantz. Constitutive neuronal expression of CCR2 chemokine receptor and its colocalization with neurotransmitters in normal rat brain: functional effect of MCP-1/CCL2 on calcium mobilization in primary cultured neurons. *J Comp Neurol* 2005b.492:178-92.
- Barichello T, MR Martins, A Reinke, LS Constantino, RA Machado, SS Valvassori, JC Moreira, J Quevedo, and F Dal-Pizzol. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res* 2007.40:831-7.
- Baune BT, F Wiede, A Braun, J Golledge, V Arolt, and H Koerner. Cognitive dysfunction in mice deficient for TNF- and its receptors. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008.147B:1056-64.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

- Blasko I, F Marx, E Steiner, T Hartmann, and B Grubeck-Loebenstein. TNFalpha plus IFNgamma induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. *FASEB J* 1999.13:63-8.
- Buccafusco JJ, and JJ Buccafusco. 2009. *Methods of behavioral analysis in neuroscience*. CRC Press, Boca Raton. xxi, 351 p. pp.
- Buschini E, A Piras, R Nuzzi, and A Vercelli. Age related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina. *Prog Neurobiol* 2011.95:14-25.
- Butterfield DA, and CB Pocernich. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 2003.17:641-52.
- Callahan LM, WA Vaules, and PD Coleman. Quantitative decrease in synaptophysin message expression and increase in cathepsin D message expression in Alzheimer disease neurons containing neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999.58:275-87.
- Cammarota M, LR Bevilaqua, P Ardenghi, G Paratcha, M Levi de Stein, I Izquierdo, and JH Medina. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res* 2000.76:36-46.
- Carvalho-Tavares J, MJ Hickey, J Hutchison, J Michaud, IT Sutcliffe, and P Kubes. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res* 2000.87:1141-8.
- Cazareth J, A Guyon, C Heurteaux, J Chabry, and A Petit-Paitel. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *J Neuroinflammation* 2014.11:132.
- Christmas AJ, and DR Maxwell. A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats. *Neuropharmacology* 1970.9:17-29.
- Citron M. Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. *Nat Neurosci* 2002.5 Suppl:1055-7.
- Corraliza IM, G Soler, K Eichmann, and M Modolell. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995.206:667-73.
- Cudaback E, Y Yang, TJ Montine, and CD Keene. APOE genotype-dependent modulation of astrocyte chemokine CCL3 production. *Glia* 2015.63:51-65.
- Davies HA, A Kelly, TM Dhanrajan, MA Lynch, JJ Rodriguez, and MG Stewart. Synaptophysin immunogold labelling of synapses decreases in dentate gyrus of the hippocampus of aged rats. *Brain Res* 2003.986:191-5.
- Del Rio-Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos. . *Bio Soc Esp Biol* 1919.9:50.
- Duarte JM, PM Agostinho, RA Carvalho, and RA Cunha. Caffeine consumption prevents diabetes-induced memory impairment and synaptotoxicity in the hippocampus of NONcZNO10/LTJ mice. *PLoS One* 2012.7:e21899.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

- Duclot F, M Lapierre, S Fritsch, R White, MG Parker, T Maurice, and V Cavailles. Cognitive impairments in adult mice with constitutive inactivation of RIP140 gene expression. *Genes Brain Behav* 2012.11:69-78.
- Eastwood SL, PW Burnet, and PJ Harrison. Altered synaptophysin expression as a marker of synaptic pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 1995.66:309-19.
- El Khoury J, M Toft, SE Hickman, TK Means, K Terada, C Geula, and AD Luster. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 2007.13:432-8.
- Floden AM, S Li, and CK Combs. Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J Neurosci* 2005.25:2566-75.
- Fonseca JE, J Goncalves, F Araujo, I Cordeiro, F Teixeira, H Canhao, JA da Silva, S Garces, LC Miranda, S Ramiro, A Roxo, FM Pimentel-Santos, V Tavares, A Neto, A Sepriano, A Malcata, A Faustino, C Silva, C Ambrosio, C Duarte, C Miguel, F Barcelos, H Santos, I Cunha, JC Ramos, JA Gomes, JB Pimentao, L Costa, L Mauricio, M Silva, M Bernardes, M Bogas, PC Coelho, P Monteiro, R Aguiar, R Andre, R Leitao, S Pimenta, T Meirinhos, S Fernandes, V Las, and W Castelao. The Portuguese Society of Rheumatology position paper on the use of biosimilars. *Acta Reumatol Port* 39:60-71.
- Frackowiak J, A Zoltowska, and HM Wisniewski. Non-fibrillar beta-amyloid protein is associated with smooth muscle cells of vessel walls in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994.53:637-45.
- Frank-Cannon TC, LT Alto, FE McAlpine, and MG Tansey. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener* 2009.4:47.
- Galimberti D, C Fenoglio, C Lovati, E Venturelli, I Guidi, B Corra, D Scalabrini, F Clerici, C Mariani, N Bresolin, and E Scarpini. Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2006.27:1763-8.
- Garringer HJ, J Murrell, N Sammeta, A Gnezda, B Ghetti, and R Vidal. Increased tau phosphorylation and tau truncation, and decreased synaptophysin levels in mutant BRI2/tau transgenic mice. *PLoS One* 2013.8:e56426.
- Gogos CA, E Drosou, HP Bassaris, and A Skoutelis. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000.181:176-80.
- Gomes RN, RT Figueiredo, FA Bozza, P Pacheco, RT Amancio, AP Laranjeira, HC Castro-Faria-Neto, PT Bozza, and MT Bozza. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock* 2006.26:457-63.
- Gordon-Krajcer W, E Salinska, and JW Lazarewicz. N-methyl-d-aspartate receptor-mediated processing of beta-amyloid precursor protein in rat hippocampal slices: in vitro--superfusion study. *Folia Neuropathol* 2002.40:13-7.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003.3:23-35.
- Greenamyre JT, and AB Young. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1989.10:593-602.
- Guyon A, D Skrzydelski, I De Giry, C Rovere, G Conductier, JM Trocello, V Dauge, P Kitabgi, W Rostene, JL Nahon, and S Melik Parsadaniantz. Long term



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

- exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience* 2009.162:1072-80.
- Heneka MT, MP Kummer, A Stutz, A Delekate, S Schwartz, A Vieira-Saecker, A Griep, D Axt, A Remus, TC Tzeng, E Gelpi, A Halle, M Korte, E Latz, and DT Golenbock. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 2013.493:674-8.
- Hensley K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. *J Alzheimers Dis* 2010.21:1-14.
- Heymann MC, S Winkler, H Luksch, S Flecks, M Franke, S Russ, S Ozen, E Yilmaz, C Klein, T Kallinich, D Lindemann, S Brenner, G Ganser, J Roesler, A Rosen-Wolff, and SR Hofmann. Human procaspase-1 variants with decreased enzymatic activity are associated with febrile episodes and may contribute to inflammation via RIP2 and NF-kappaB signaling. *J Immunol* 2014.192:4379-85.
- Hirsch EC. [Future drug targets for Parkinson's disease]. *Bull Acad Natl Med* 2012.196:1369-77; discussion 1377-9.
- Hitomi J, T Katayama, M Taniguchi, A Honda, K Imaizumi, and M Tohyama. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci Lett* 2004.357:127-30.
- Hoffmann S, M Tittgemeyer, and DY von Cramon. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2007.20:275-80.
- Hryniewicz A, I Bialuk, KA Kaminski, and MM Winnicka. Impairment of recognition memory in interleukin-6 knock-out mice. *Eur J Pharmacol* 2007.577:219-20.
- Hsiao K, P Chapman, S Nilsen, C Eckman, Y Harigaya, S Younkin, F Yang, and G Cole. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996.274:99-102.
- Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2004.5:347-60.
- Inaji M, H Tomita, O Tone, M Tamaki, R Suzuki, and K Ohno. Chronological changes of perihematoma edema of human intracerebral hematoma. *Acta Neurochir Suppl* 2003.86:445-8.
- Ishige K, N Takagi, T Imai, WD Rausch, Y Kosuge, T Kihara, K Kusama-Eguchi, H Ikeda, AR Cools, JL Waddington, N Koshikawa, and Y Ito. Role of caspase-12 in amyloid beta-peptide-induced toxicity in organotypic hippocampal slices cultured for long periods. *J Pharmacol Sci* 2007.104:46-55.
- Ishizuka K, T Kimura, R Igata-yi, S Katsuragi, J Takamatsu, and T Miyakawa. Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 1997.51:135-8.
- Izquierdo I. 2011. Memória.
- Janeway C. 2005. Immunobiology : the immune system in health and disease. Garland Science, New York. xxiii, 823 p. pp.
- Kettenmann H, UK Hanisch, M Noda, and A Verkhratsky. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011.91:461-553.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

- Kim BO, Y Liu, BY Zhou, and JJ He. Induction of C chemokine XCL1 (lymphotactin/single C motif-1 alpha/activation-induced, T cell-derived and chemokine-related cytokine) expression by HIV-1 Tat protein. *J Immunol* 2004.172:1888-95.
- Kim DH, JM Kim, SJ Park, S Lee, CY Shin, JH Cheong, and JH Ryu. Hippocampal extracellular signal-regulated kinase signaling has a role in passive avoidance memory retrieval induced by GABAA Receptor modulation in mice. *Neuropsychopharmacology* 2012.37:1234-44.
- Kim JS, SC Gautam, M Chopp, C Zaloga, ML Jones, PA Ward, and KM Welch. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neuroimmunol* 1995.56:127-34.
- Koenigsknecht-Talboo J, and GE Landreth. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 2005.25:8240-9.
- Koprach JB, C Reske-Nielsen, P Mithal, and O Isacson. Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 2008.5:8.
- Kulic L, J McAfoose, T Welt, C Tackenberg, C Spani, F Wirth, V Finder, U Konietzko, M Giese, A Eckert, K Noriaki, T Shimizu, K Murakami, K Irie, S Rasool, C Glabe, C Hock, and RM Nitsch. Early accumulation of intracellular fibrillar oligomers and late congophilic amyloid angiopathy in mice expressing the Osaka intra-Abeta APP mutation. *Transl Psychiatry* 2012.2:e183.
- LaFerla FM, KN Green, and S Oddo. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2007.8:499-509.
- Launer LJ, and A Hofman. Frequency and impact of neurologic diseases in the elderly of Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurology* 2000.54:S1-8.
- Lent R. 2004. Cem Bilhões de Neurônios.
- Lessmann V, K Gottmann, and R Heumann. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport* 1994.6:21-5.
- Lewis CA, J Manning, F Rossi, and C Krieger. The Neuroinflammatory Response in ALS: The Roles of Microglia and T Cells. *Neurol Res Int* 2012.2012:803701.
- Louboutin JP, and DS Strayer. Relationship between the chemokine receptor CCR5 and microglia in neurological disorders: consequences of targeting CCR5 on neuroinflammation, neuronal death and regeneration in a model of epilepsy. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013.12:815-29.
- MacMicking J, QW Xie, and C Nathan. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997.15:323-50.
- Mamik MK, and A Ghorpade. Chemokine CXCL8 promotes HIV-1 replication in human monocyte-derived macrophages and primary microglia via nuclear factor-kappaB pathway. *PLoS One* 2014.9:e92145.
- Mantovani A, A Sica, S Sozzani, P Allavena, A Vecchi, and M Locati. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004.25:677-86.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

- McManus C, JW Berman, FM Brett, H Staunton, M Farrell, and CF Brosnan. MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol* 1998.86:20-9.
- Mehndiratta P, S Manjila, T Ostergard, S Eisele, ML Cohen, C Sila, and WR Selman. Cerebral amyloid angiopathy-associated intracerebral hemorrhage: pathology and management. *Neurosurg Focus* 2012.32:E7.
- Moller T. Neuroinflammation in Huntington's disease. *J Neural Transm* 2010.117:1001-8.
- Monteclaro FS, and IF Charo. The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation. *J Biol Chem* 1996.271:19084-92.
- Morris SM, Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J Nutr* 2007.137:1602S-1609S.
- Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 2009.158:638-51.
- Nataf S. Neuroinflammation responses and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 2009.165:1023-8.
- Nimmerjahn A, F Kirchhoff, and F Helmchen. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005.308:1314-8.
- Ott A, RP Stolk, F van Harskamp, HA Pols, A Hofman, and MM Breteler. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 1999.53:1937-42.
- Paolicelli RC, G Bolasco, F Pagani, L Maggi, M Scianni, P Panzanelli, M Giustetto, TA Ferreira, E Guiducci, L Dumas, D Ragozzino, and CT Gross. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011.333:1456-8.
- Penfield W. 1932. *Cytology & cellular pathology of the nervous system*, New York.
- Prut L, and C Belzung. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003.463:3-33.
- Puolivali J, J Wang, T Heikkinen, M Heikkila, T Tapiola, T van Groen, and H Tanila. Hippocampal A beta 42 levels correlate with spatial memory deficit in APP and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2002.9:339-47.
- Ransohoff RM, TA Hamilton, M Tani, MH Stoler, HE Shick, JA Major, ML Estes, DM Thomas, and VK Tuohy. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J* 1993.7:592-600.
- Reis PA, CM Comim, F Hermani, B Silva, T Barichello, AC Portella, FC Gomes, IM Sab, VS Frutuoso, MF Oliveira, PT Bozza, FA Bozza, F Dal-Pizzol, GA Zimmerman, J Quevedo, and HC Castro-Faria-Neto. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *PLoS Pathog* 2010.6:e1000963.
- Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 2009.9:429-39.
- Rogers JT, JM Morganti, AD Bachstetter, CE Hudson, MM Peters, BA Grimmig, EJ Weeber, PC Bickford, and C Gemma. CX3CR1 deficiency leads to impairment



- of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci* 2011.31:16241-50.
- Ross FM, SM Allan, NJ Rothwell, and A Verkhratsky. A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. *J Neuroimmunol* 2003.144:61-7.
- Sabino B, MA Lessa, AR Nascimento, CA Rodrigues, M Henriques, LR Garzoni, BI Levy, and E Tibirica. Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008.51:402-9.
- Scott AM, and M Saleh. The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis. *Cell Death Differ* 2007.14:23-31.
- Semple BD, N Bye, M Rancan, JM Ziebell, and MC Morganti-Kossmann. Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): evidence from severe TBI patients and CCL2-/- mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010.30:769-82.
- Shaftel SS, WS Griffin, and MK O'Banion. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation* 2008.5:7.
- Shastri A, DM Bonifati, and U Kishore. Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators Inflamm* 2013.2013:342931.
- Sheridan GK, A Wdowicz, M Pickering, O Watters, P Halley, NC O'Sullivan, C Mooney, DJ O'Connell, JJ O'Connor, and KJ Murphy. CX3CL1 is up-regulated in the rat hippocampus during memory-associated synaptic plasticity. *Front Cell Neurosci* 2014.8:233.
- Sierra A, JM Encinas, JJ Deudero, JH Chancey, G Enikolopov, LS Overstreet-Wadiche, SE Tsirka, and M Maletic-Savatic. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 2010.7:483-95.
- Smith JA, A Das, SK Ray, and NL Banik. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 2012.87:10-20.
- Souto FO, JC Alves-Filho, WM Turato, M Auxiliadora-Martins, A Basile-Filho, and FQ Cunha. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011.183:234-42.
- Steiner H, E Winkler, D Edbauer, S Prokop, G Basset, A Yamasaki, M Kostka, and C Haass. PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* 2002.277:39062-5.
- Sun JH, L Tan, and JT Yu. Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management. *Ann Transl Med* 2014.2:80.
- Svoboda K, W Denk, D Kleinfeld, and DW Tank. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 1997.385:161-5.
- Takahashi JL, F Giuliani, C Power, Y Imai, and VW Yong. Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann Neurol* 2003.53:588-95.
- Tansey MG, MK McCoy, and TC Frank-Cannon. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 2007.208:1-25.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

- Thompson WL, WJ Karpus, and LJ Van Eldik. MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *J Neuroinflammation* 2008.5:35.
- Thored P, U Heldmann, W Gomes-Leal, R Gisler, V Darsalia, J Taneera, JM Nygren, SE Jacobsen, CT Ekdahl, Z Kokaia, and O Lindvall. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* 2009.57:835-49.
- Tucsek Z, P Toth, S Tarantini, D Sosnowska, T Gautam, JP Warrington, CB Giles, JD Wren, A Koller, P Ballabh, WE Sonntag, Z Ungvari, and A Csiszar. Aging exacerbates obesity-induced cerebrovascular rarefaction, neurovascular uncoupling, and cognitive decline in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014.69:1339-52.
- Tuon L, CM Comim, F Petronilho, T Barichello, I Izquierdo, J Quevedo, and F Dal-Pizzol. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med* 2008.34:1724-31.
- Vassar R, BD Bennett, S Babu-Khan, S Kahn, EA Mendiaz, P Denis, DB Teplow, S Ross, P Amarante, R Loeloff, Y Luo, S Fisher, J Fuller, S Edenson, J Lile, MA Jarosinski, AL Biere, E Curran, T Burgess, JC Louis, F Collins, J Treanor, G Rogers, and M Citron. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999.286:735-41.
- Vidal JS, S Sigurdsson, MK Jonsdottir, G Eiriksdottir, G Thorgeirsson, O Kjartansson, ME Garcia, MA van Buchem, TB Harris, V Gudnason, and LJ Launer. Coronary artery calcium, brain function and structure: the AGES-Reykjavik Study. *Stroke* 2010.41:891-7.
- Vinet J, HR Weering, A Heinrich, RE Kalin, A Wegner, N Brouwer, FL Heppner, N Rooijen, HW Boddeke, and K Biber. Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *J Neuroinflammation* 2012.9:27.
- Vozeh F, J Voller, and J Cendelin. Neural functional and morphological consequences of retinal degeneration in C3H Lurcher mutant and wild type mice. *Prague Med Rep* 2006.107:95-102.
- Wang X, TL Yue, FC Barone, and GZ Feuerstein. Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 1995.26:661-5; discussion 665-6.
- Westin K, P Buchhave, H Nielsen, L Minthon, S Janciauskiene, and O Hansson. CCL2 is associated with a faster rate of cognitive decline during early stages of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2012.7:e30525.
- Wilson EH, W Weninger, and CA Hunter. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest* 2010.120:1368-79.
- Wolfe MS, W Xia, BL Ostaszewski, TS Diehl, WT Kimberly, and DJ Selkoe. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 1999.398:513-7.
- Wong LM, SJ Myers, CL Tsou, J Gosling, H Arai, and IF Charo. Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking. *J Biol Chem* 1997.272:1038-45.



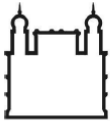
Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

- Wood PL. 2003. Neuroinflammation : mechanisms and management. Humana Press, Totowa, N.J. 419 p. pp.
- Yamada K, and T Nabeshima. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 2003.91:267-70.
- Yamasaki R, L Liu, J Lin, and RM Ransohof. Role of CCR2 in immunobiology and neurobiology. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2011.3:13.
- Yirmiya R, G Winocur, and I Goshen. Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 2002.78:379-89.
- Zhou Y, H Tang, J Liu, J Dong, and H Xiong. Chemokine CCL2 modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 2011.116:406-14.
- Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* 2011.12:723-38.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANEXO I



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-36/10

Certificamos que o protocolo (P-95/09-4), intitulado "INTERFERÊNCIA DE CONDIÇÕES PRÉ-EXISTENTES NA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO: VIAS METABÓLICAS E DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO DESBALANÇO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA SEPSIS", sob a responsabilidade de HUGO CAIRE DE CASTRO NETO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 04/10/2014 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 4800 Machos de Swiss Webster, Idade: 3 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 1000 Machos de C57BL/6, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).
- 440 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 100 Machos de C3H/He, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 100 Machos de C3H/HeJ, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 430 Machos de B6. 129, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000.
- 120 Fêmeas de B6. 129, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 80 Machos de B6. 129 P2 - Nos2, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).
- 20 Fêmeas de B6. 129 P2 - Nos2, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

(Continua)



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-36/10

(Continuação da Licença Nº LW-36/10, Protocolo Nº P-95/09-4)

Mus musculus

- 60 Machos de B6. 129 S1 - Il 12b, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).
- 20 Fêmeas de B6. 129 S1 - Il 12b, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 130 Machos de B6.129P2-Ccr2, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).
- 20 Fêmeas de B6.129P2-Ccr2, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 60 Machos de B6. 129S7 - Ifng, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).
- 20 Fêmeas de B6. 129S7 - Ifng, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 40 Machos de B6. 129 - Tnfrs1a, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).
- 20 Fêmeas de B6. 129 - Tnfrs1a, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 12 Machos de Swiss Webster, Idade: 14 Mes(es).

Mus musculus

- 60 Machos de C.129S4(B6)-Mlf.
- 40 Fêmeas de C.129S4(B6)-Mlf.

Rio de Janeiro, 4 de outubro de 2010

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANEXO II



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Relatório do Monitoramento Genético Animal da linhagem B6.129P2-Ccr2
Rio de Janeiro, 11 de abril de 2014.

Solicitante:	Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos (SCRL)
Responsável pela solicitação:	Thais Veronez
Origem dos animais:	Sala A3 do SCRL
Data de entrada das amostras:	24 de março de 2014
Período da extração:	24 e 25 de março de 2014
Período dos ensaios:	26/03 a 08/04/2014
Linhagem:	B6.129P2-Ccr2
Nomes Comuns:	Ccr2 ^{-/-} ; Cmkbr2.
Classificação:	Knockout
Gene pesquisado:	Receptor de quimiocina 2 (Ccr2)

	Resultado esperado:
Mutante (-/-)	280 pares de bases
Heterozigoto (+/-)	424 pares de bases e 280 pares de bases
Tipo Selvagem - WT (+/+)	424 pares de bases

IDI*	IDE**	Nascimento / Sexo	Resultados
273/14 -1	Caixa 74/10	196/13 ♀	280 pares de bases (-/-)
273/14 -2	Caixa 74/10	196/13 ♂	280 pares de bases (-/-)
273/14 -3	Caixa 75/10	254/13 ♀	280 pares de bases (-/-)
273/14 -4	Caixa 75/10	254/13 ♂	280 pares de bases (-/-)
273/14 -5	Caixa 76/10	254/13 ♀	280 pares de bases (-/-)
273/14 -6	Caixa 76/10	254/13 ♂	280 pares de bases (-/-)
273/14 -7	Caixa 77/10	254/13 ♀	280 pares de bases (-/-)
273/14 -8	Caixa 77/10	254/13 ♂	280 pares de bases (-/-)
273/14 -9	Caixa A/10	308/13 ♀	280 pares de bases (-/-)
273/14 -10	Caixa A/10	308/13 ♂	280 pares de bases (-/-)
273/14 -11	Caixa B/10	308/13 ♀	280 pares de bases (-/-)
273/14 -12	Caixa B/10	308/13 ♂	280 pares de bases (-/-)
273/14 -13	Caixa C/11	361/13 ♀	280 pares de bases (-/-)
273/14 -14	Caixa C/11	361/13 ♂	280 pares de bases (-/-)

*IDI=identificação interna (uso exclusivo do SCQA); **IDE=identificação externa (enviada pelo solicitante)

Serviço de Controle da Qualidade Animal (SCQA)

Liberado por: Vanessa Borges
Verificado por: Igor Regis e Lilian Gonçalves



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



(Continuação)

Solicitante:	Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos (SCRL)
Responsável pela solicitação:	Thais Veronez
Origem dos animais:	Sala A3 do SCRL
Data de entrada das amostras:	24 de março de 2014
Período da extração:	24 e 25 de março de 2014
Período dos ensaios:	26/03 a 08/04/2014
Linhagem:	B6.129P2-Ccr2
Nomes Comuns:	Ccr2 ^{-/-} ; Cmkbr2.
Classificação:	Knockout
Gene pesquisado:	Receptor de quimiocina 2 (Ccr2)

Notas importantes:

Os genótipos dos animais foram identificados e registrados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Realizamos a prova e contraprova de todas as análises, de acordo com amostras padrão de genótipos conhecidos (controle interno do SCQA).

Estes resultados são baseados na correta identificação das amostras biológicas coletadas pelo solicitante e enviadas ao SCQA.

Conclusão:

Amostras que apresentaram como produto da região analisada alelos com os pares de bases de acordo com o padrão sugerem a permanência da autenticidade genética da linhagem B6.129P2-Ccr2.

Liberado por: Vanessa Borges
Verificado por: Igor Regis e Lillian Gonçalves

Serviço de Controle da Qualidade Animal (SCQA)



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANEXO III



NIH Public Access

Author Manuscript

Shock. Author manuscript; available in PMC 2013 March 08.

Published in final edited form as:

Shock. 2013 January ; 39(1): 63–69. doi:10.1097/SHK.0b013e31827802b5.

BACTERIAL CLEARANCE IN SEPTIC MICE IS MODULATED BY MCP-1/CCL2 AND NITRIC OXIDE

Rachel N. Gomes^{*,†}, Mariana G. A. Teixeira-Cunha^{*}, Rodrigo T. Figueiredo[‡], Patricia E. Almeida^{*}, Silvio C. Alves^{*}, Patricia T. Bozza^{*}, Fernando A. Bozza[†], Marcelo T. Bozza[§], Guy A. Zimmerman^{||}, and Hugo C. Castro-Faria-Neto^{*}

^{*}Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz

[†]Laboratório Integrado de Medicina Intensiva, Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, FIOCRUZ

[‡]Pólo de Xerém, Instituto de Ciências Biomédicas

[§]Laboratório de Inflamação e Imunidade, Instituto de Microbiologia, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

^{||}Department of Internal Medicine, University of Utah, Salt Lake City, Utah

Abstract

Bacterial clearance is one of the most important beneficial consequences of the innate immune response. Chemokines are important mediators controlling leukocyte trafficking and activation, whereas reactive oxygen and nitrogen species are effectors in bacterial killing. In the present work, we used *in vivo* and *in vitro* models of infections to study the role of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)/CCL2 and nitric oxide (NO) in the bacterial clearance in sepsis. Our results show that MCP-1/CCL2 and NO levels are increased in the peritoneal cavity of mice 6 h after sepsis induced by cecal ligation and puncture. Pretreatment with anti-MCP-1/CCL2 monoclonal antibodies increased the number of colony-forming units (CFUs) recovered in the peritoneal lavage fluid. Moreover, CFU counts were increased in the peritoneal fluid of CCR2^{-/-} mice subjected to cecal ligation and puncture. *In vitro* stimulation of peritoneal macrophages with recombinant MCP-1/CCL2 reduced CFU counts in the supernatant after challenge with *Escherichia coli*. Conversely, treatment with anti-MCP-1/CCL2 increased CFU counts under the same experimental condition. Stimulation of cultured macrophages with MCP-1/CCL2 and interferon had a synergistic effect on NO production. Macrophages from CCL2^{-/-} mice showed a consistent decrease in NO production when compared with wild-type controls after stimulation with LPS + interferon. Finally, we showed incubation of macrophages with *E. coli*, and the ERK inhibitor U0126 increased CFU numbers and decreased intracellular levels of NO. In conclusion, we demonstrated for the first time that MCP-1/CCL2 has a crucial role in the clearance of bacteria by mechanisms involving increased expression of inducible NO synthase and production of NO by ERK signaling pathways.

Keywords

Chemokines; nitric oxide; bacterial infection; phagocytosis

Copyright © 2013 by the Shock Society

Address reprint requests to Hugo C. Castro-Faria-Neto, PhD, Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, IOC, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. hcastro@ioc.fiocruz.br. R.N.G. and M.G.A.T.-C. contributed equally to this work.

The authors have declared that no competing interests exist.

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript



INTRODUCTION

Sepsis is a major cause of death worldwide. Approximately 750,000 cases of sepsis occur annually in the United States, with a mortality rate of 28.6% (1, 2). Current evidence indicates that dysregulation of the host inflammatory response to the infectious agent is central to the mortality of patients with sepsis. Although regulated inflammation is important to control bacterial infection, an excessive systemic inflammatory response can lead to shock and early mortality (3). Factors related to the infectious agent that trigger the immune/inflammatory responses are amplified by molecules of the host origin including cytokines, chemokines, lipid mediators, and reactive oxygen species. These inflammatory mediators influence the recruitment and activation of leukocytes affecting pathogen clearance at a potential cost of promoting tissue damage (4).

Chemokines are critically involved in leukocyte migration but also affect the biology of leukocytes in several ways (5). Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)/CCL2 is the prototype of the CC chemokine subfamily and exhibits the most potent chemotactic activity for monocytes. Collectively, both experimental and clinical studies have clearly established a key role of MCP-1/CCL2 in the pathogenesis of macrophage-driven inflammatory diseases, such as atherosclerosis (6). In sepsis, studies suggested a protective role of MCP-1/CCL2, where it promotes the balance between anti-inflammatory and proinflammatory responses to infection. Treatment with recombinant MCP-1/CCL2 increased bacterial clearance and protected mice systemically infected with *Pseudomonas aeruginosa* or *Salmonella typhimurium* (7). Also, the pretreatment of mice with anti-MCP-1/CCL2 increased lethality and was associated with impaired bacterial clearance and reduced leukocyte recruitment in a model of peritoneal sepsis (8). In another study, administration of MCP-1/CCL2 24 h after the induction of sepsis promoted tissue repair by inducing phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages (9).

We demonstrated that animals genetically deficient in the receptor for MCP-1/CCL2, CCR2, are more susceptible to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) (10). In another study, we observed similar results when we used the knockout mice for the MCP-1/CCL2 chemokine. These animals were more susceptible to systemic inflammatory response syndrome induced by LPS and to CLP model, and this susceptibility was associated with a poor balance between proinflammatory and anti-inflammatory factors. We identified MCP-1/CCL2 as a positive regulator of IL-10 and a negative regulator of the proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor, thus suggesting the mechanism for the increased lethality rate in the absence of MCP-1/CCL2 and the important immunomodulatory role for MCP-1/CCL2 in sepsis (11). Nevertheless, previous studies failed to address the impact of MCP-1/CCL2 signaling on the control of the infection and the involved mechanism.

In addition to MCP-1/CCL2, other mediators favor the elimination of bacteria by macrophages. It is well described in the literature that nitric oxide (NO) has an important role in host defense against infection and especially in bacterial elimination. The role of NO in sepsis has been controversial, since pharmacological manipulation of NO synthesis in septic patients was shown to be both deleterious and beneficial (12, 13). Increased NO synthesis following NO synthase (NOS) II induction plays a major part in the host defense against viral and bacterial pathogens and in the containment of tumor growth, yet elevated levels of NO can also exert deleterious effects in many acute inflammatory responses and chronic diseases (14). Endogenous NO production was associated to an increase in survival rate and to decreased numbers of bacteria in the lung and blood of animals inoculated with *Klebsiella pneumoniae*, indicating an important role of NO in the bacterial elimination by macrophages under septic conditions (15).



A connection between MCP-1/CCL2 and NO pathways has been established in models of tumoricidal activity (16), but this has not yet been studied in infectious conditions, nor a potential intracellular pathway been proposed in these circumstances.

In the present study, we investigate the role of MCP-1/CCL2 and NO in the clearance of bacteria after induction of polymicrobial sepsis, exploring the interrelationship between these mediators and the signaling pathways involved.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Swiss and C57BL/6 mice from the Oswaldo Cruz Foundation breeding unit weighing 20 to 25g were used for the studies. The animals were kept at a constant temperature (25°C) with free access to food and water in a room with a 12-h light-dark cycle. In this set of experiments, a C57BL/6 background was used with mice deficient in MCP-1/CCL2 chemokine (MCP-1/CCL2^{-/-}), mice deficient in the MCP-1/CCL2 receptor CCR2 (CCR2^{-/-}), or mice deficient in inducible NO synthase (iNOS^{-/-}). The experiments in this study were approved by the Oswaldo Cruz Institute's Animal Welfare Committee.

Materials

Murine recombinant MCP-1/CCL2 and murine recombinant interferon γ (IFN- γ) were from Peprotech (Rocky Hill, NJ). Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* 0111:B4, Griess reagent, and L-NAME (L-NG-nitroarginine methyl ester) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo). Thiopental (Thionembutal) was from Abbott Labs do Brasil, LTDA (São Paulo, Brazil), and ketamine was from Cristália (São Paulo, Brazil).

Cecal ligation and puncture

Mice were anesthetized with a mixture of thiopental (40 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) diluted in sterile saline and administered intraperitoneally (0.2 mL). Laparotomy was performed, and the cecum was exposed and ligated below the ileocecal junction with care to avoid bowel obstruction. The cecum was punctured once with an 18-gauge needle and was then gently squeezed to empty its contents through the puncture. The cecum was returned to the peritoneal cavity, and the abdominal muscle and skin incisions were closed in layers using a 3-0 nylon suture line. Immediately after the surgery, 0.5 mL of sterile saline was administered subcutaneously to the animals for volume resuscitation. Sham-operated mice were subjected to identical procedures except that ligation and puncture of the cecum were omitted.

Septic animals were rated as healthy (score of 0 points) or to have mild sepsis (score of 2 points), moderate sepsis (score of 3–4 points), or severe sepsis (score of 5–6 points) by a blinded observer using a severity score composed of the following parameters and respective awarded points: appearance (0 = normal, 1 = piloerection), activity (0 = active, 1 = lethargic), awareness (0 = alert, 1 = lethargic, 2 = moribund), breathing (0 = normal, 1 = amended), and appearance of eyes (0 = normal, 1 = with secretion).

Animals subjected to CLP developed early signs of sepsis, including lethargy, piloerection, and diarrhea. Survival of mice subjected to CLP or sham injury was determined daily for 7 days. The model performed as described above yielded a 7-day mortality rate of around 10% to 20% and a severity score of three points at 6 h (moderate sepsis) for C57BL/6 wild-type (WT) animals and Swiss mice. CCR2^{-/-} mice had a 7-day mortality rate of around 70% and a severity score of four to five points at 6 h (severe sepsis).



Bacteria inoculation

For these experiments, we used the *E. coli* ATCC25922 strain grown in LB medium from a single colony (10 g peptone, 5 g of yeast extract, and 10g NaCl, pH 7, sterilized by autoclaving at 120°C for 30 min). Mice were inoculated intraperitoneally with *E. coli* (5×10^5 bacteria/cavity). After 6 h, the peritoneal cavity was washed, and lavage fluid was collected to measure colony-forming units (CFUs) and NO levels.

Treatments

Treatment with L-NAME (10 mg/kg) or anti-MCP-1/CCL2 (250 µg/kg) was done 2 h after the CLP surgery by intraperitoneal injection. The ERK pathway inhibitor, U0126 (13 µM), was added to macrophage cultures 15 min before MCP-1/CCL2 and *E. coli* stimulation.

Cytokine measurements

The magnitude of the inflammatory response was evaluated by measuring the levels of MCP-1/CCL2 in the peritoneal fluid, using enzyme-linked immunosorbent assay technique with specific monoclonal antibodies, according to the manufacturer's instructions (Duo Set Kit from R&D Systems, Minneapolis, Minn). Mice were killed in a CO₂ chamber at designated time points, and the peritoneal cavity was opened and rinsed with Hanks balanced saline solution without calcium (Ca²⁺) or magnesium (Mg²⁺). The particulate matter was removed by centrifugation at 800g for 10 min, and the supernatant fractions were used for immunoassays.

Determination of CFUs

Twelve microliters of peritoneal lavage fluid from each mouse was placed on ice and was serially diluted with sterile saline. Twelve microliters of each dilution was placed on agar plates and incubated overnight at 37°C, after which the number of colonies was counted with the aid of a colony counter.

In vitro stimulation of peritoneal macrophages

Mice received an intraperitoneal dose of 3 mL of thioglycollate (3%; Sigma). Three days later, they were killed, and the peritoneal macrophages were obtained by washing the peritoneal cavity with 3 mL of saline. One million cells in RPMI media were distributed in 24-well culture plates and were placed into a 37°C CO₂ incubator for 2 h. All nonadherent cells were subsequently removed, and the adherent cells were treated with MCP-1/CCL2 (100 ng/mL), anti-MCP-1/CCL2 (10 ng/mL), LPS from *E. coli* 0111: B4 (300 µg/mL), or IFN-γ (20 ng/mL) and after 1 h stimulated with live *E. coli* (10^5 bacteria/mL). The supernatants were removed 30 min after the stimulation and used for CFU counting and measurement of NO production. The cell viability was determined by trypan blue dye exclusion at the end of each experiment and was never lower than 90% for all experiments. To study the effect of ERK inhibitor, cells were pretreated with U0126 (13 µM) at 37°C for 15 min before treatment with MCP-1/CCL2 (100 ng/mL).

NO measurements

Mice were killed in a CO₂ chamber at designated time points, and the peritoneal cavity was opened and rinsed with phosphate-buffered saline (PBS). The peritoneal fluid, or supernatant from peritoneal macrophages culture as described above, was collected and centrifuged for nitrite level determinations using Griess reagent, which detects NO₂⁻, a primary stable and nonvolatile breakdown product of NO. The Griess Reagent System is based on a chemical reaction that uses sulfanilamide and N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride under acidic (phosphoric acid) conditions.



investigate the role of MCP-1/CCL2 in bacterial clearance, the animals were treated with anti-MCP-1/CCL2, 1 h before CLP, and the peritoneal fluid was collected 6 h later and plated in agar plates for CFU determination. As shown in Figure 1B, CFU numbers were significantly increased in anti-MCP-1/CCL2-treated animals when compared with the control group. This result is additional evidence for the involvement of MCP-1/CCL2 in controlling bacterial clearance using the well-established and clinically relevant polymicrobial model of sepsis induced by CLP. Similar results were obtained when we used *CCR2*^{-/-} mice in another model of bacterial sepsis. Challenge of *CCR2*^{-/-} animals with *E. coli* (5×10^4 /animal, i.p.; Fig. 2A) showed an increase in CFU numbers recovered from the peritoneal fluid as compared with WT animals, indicating that negative modulation of MCP-1/CCL2 signaling has a detrimental effect on bacterial clearance in different models of sepsis.

We also investigated the role of MCP-1/CCL2 in bacterial clearance using an *in vitro* model of gram-negative (*E. coli*) infection. Peritoneal macrophages were collected, plated, and treated with recombinant MCP-1/CCL2 or anti-MCP-1/CCL2 before the incubation with *E. coli*. Colony-forming units were then determined in the supernatant 30 min later. Similar to our results in the *in vivo* CLP model, we found that treatment of macrophages with anti-MCP-1/CCL2 caused a significant increase in CFU numbers after incubation with *E. coli* (Fig. 2B). On the other hand, decreased CFU numbers were detected after treatment of macrophages with recombinant MCP-1/CCL2 before incubation with *E. coli* (Fig. 2C).

NO is required for elimination of bacteria in the CLP model

A variety of studies demonstrate that NO is an innate bactericidal effector molecule (18, 19). Enhanced NO production by macrophages and neutrophils is a critical defense mechanism in many fungal and bacterial infections (20). Initially, we measured the levels of NO in the peritoneal cavity after the CLP procedure. We observed an increase in NO levels 6 h after CLP when compared with the sham-operated control group (Fig. 3). Next, we used L-NAME (20 mg/kg) treatment to block NO synthesis and observed an increase in CFU counts in mice subjected to CLP (Fig. 4A). In addition, mice genetically deficient in the inducible isoform of NO synthase (*iNOS*^{-/-}) were submitted to CLP, and 6 h after the procedure, the peritoneal fluid was collected and plated for CFU counts. As shown in Figure 4B, and in agreement with the pharmacological blockage of NO synthesis, CFU counts were markedly increased in animals genetically deficient of NOS. Together with these results, an important role for NO is suggested in the bacterial elimination in septic mice.

MCP-1/CCL2 is a trigger for NO production and bacterial clearance

In view of the above results, we examined the possibility that there is a link between the production of MCP-1/CCL2 and NO in our models of infection. First, we observed that NO production after CLP was decreased by anti-MCP-1/CCL2 treatment (250 µg/kg) (Fig. 3). Similarly, NO levels were significantly decreased in *CCR2*^{-/-} animals submitted to CLP as compared with the WT septic group (data not shown). We also treated peritoneal macrophages *in vitro* with recombinant MCP-1/CCL2 and IFN-γ and measured NO levels after 24 h. Figure 5A shows that cotreatment with MCP-1/CCL2 and IFN-γ increased the production of NO. Next, we treated peritoneal macrophages from MCP-1/CCL2^{-/-} and WT mice with LPS, IFN-γ, or LPS + IFN-γ. As shown in Figure 5B, we observed a consistent decrease in NO production for all treatment groups in macrophages from MCP-1/CCL2^{-/-} mice when compared with the macrophages from the WT control group.

To investigate if NO production was related to the MCP-1/CCL2 signaling, we looked at iNOS expression by immunofluorescence in peritoneal macrophages after stimulation with *E. coli* and MCP-1/CCL2. As indicated in Figure 6A, stimulation of peritoneal macrophages



from WT mice with MCP-1/CCL2, *E. coli*, or both increased the phosphorylation of pERK and increased the expression of iNOS when both stimuli were done together. The increase in pERK under the same conditions was confirmed by Western blotting (Fig. 6B). In addition, Figure 6 shows a decrease in pERK after treatment with ERK inhibitor U0126 (13 μ M). Furthermore, incubation of macrophages with U0126 before stimulation with MCP-1/CCL2 and *E. coli* increased CFU numbers in the culture supernatant (Fig. 7A) and decreased intracellular levels of NO detected by the use of DAF probing (Fig. 7B). These results suggest that the mechanisms involved in NO production by murine peritoneal macrophages after MCP-1/CCL2 treatment are associated with the ERK1/2 signaling pathway and that NO is essential for the control of the bacterial load in this model of sepsis.

DISCUSSION

Early studies suggested that the mortality and organ injury associated with severe sepsis are primarily due to an exaggerated inflammatory response. Nevertheless, despite the association of inflammation with mortality, anti-inflammatory therapies have, for the most part, failed to significantly improve clinical outcomes (21). This may suggest that the balance between beneficial and detrimental effects of innate immune responses, that is, inflammation, is far more intricate than anticipated.

The control of bacterial burden is a key event in the management of septic patients. Antibacterial therapy is therefore required early after diagnosis, and its delay has a clear impact on mortality (22, 23). It has been long recognized that the most striking beneficial effect of the inflammatory response to an invading organism is the control of the spreading of the infection and the tissue colonization by the pathogenic organism. In this respect, phagocytosis by competent cells and the production of oxygen and nitrogen reactive species occupy a central role in the innate immune response dealing with control and/or elimination of the invading microorganism. Chemokines are known to control leukocyte influx to tissues under inflammatory conditions (24). Monocyte chemoattractant protein 1/CCL2 is a key chemokine that can recruit monocytes, macrophages, and lymphocytes by a mechanism dependent on its binding to the CCR2 receptor, but other activities such as an indirect control of neutrophil migration under infectious conditions have also been described (25). Our findings in this work, together with that in a previous publication (11), indicate that endogenous MCP-1/CCL2 protects mice from sepsis by regulating proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production. We observed that, after CLP, the levels of MCP-1/CCL2 were increased and that blocking of this chemokine using anti-MCP-1/CCL2 antibodies caused an increase in CFU counts. This result suggested that the protective role of MCP-1/CCL2 may be related to its ability to limit bacterial load. Similarly, the increased bactericidal response to listeriosis after sepsis is related to CCR2-dependent recruitment of myeloid cells to the spleen and liver (26), adding support to the idea that MCP-1/CCL2 has important actions in the control of bacterial elimination in different preclinical models of infection. More importantly, we could mimic the effects of MCP-1/CCL2 in the control of bacterial clearance using an *in vitro* system of cultured macrophages challenged with *E. coli* as an infectious agent. In this system, stimulation of macrophages with recombinant MCP-1/CCL2 increased bacterial clearance, whereas incubation with anti-MCP-1/CCL2 monoclonal antibodies increased the numbers of CFUs in the culture supernatant. This important observation confirmed our current and previous observations in animal models and opened the possibility for mechanistic studies dissecting the molecular pathways involved in this effect.

The production of NO is critical for killing bacteria in different infectious conditions (27). Nitric oxide is produced by three different forms of NOS, namely, neuronal NOS (or NOS1), endothelial NOS (or NOS3), and iNOS (or NOS2). Because of the huge difference



in the amount of NO produced, it has been generally assumed that neuronal NOS and endothelial NOS are critical for a normal physiology, whereas iNOS is associated more with injury (28). Inducible NOS-derived NO influences the physiological functions of most leukocytes and is implicated in phagocytic, antimicrobial, and tumoricidal activities (29, 30). However, the excessive production of NO by immune cells and nonimmune cells such as endothelial, epithelial, and smooth muscle cells can also lead to tissue damage, as demonstrated by the protective effects of NOS inhibitors in many inflammatory and autoimmune disease models (14). We confirmed previous studies showing that NO production is significantly increased after CLP or other septic conditions (31). Our results point to NO as an effector molecule in bacterial clearance in our polymicrobial model of sepsis. The role of NO in sepsis has been hotly contested, because pharmacological manipulation of NO synthesis in septic patients has been shown to be both deleterious and beneficial (12, 13, 32). The deleterious effects of NOS inhibition are related in part to the inability of NOS substrate inhibitors to discriminate between the constitutive and inducible isoforms of NOS, whereas the beneficial effects of these compounds have been attributed to the ability of NOS inhibitors to restore normal cardiovascular function in septic patients (32). Nitric oxide production in the early phases of sepsis is likely to contribute, together with respiratory burst, to efficient microbial clearance by phagocytic cells, especially because respiratory burst and NO-derived mediators have well-known antimicrobial activities (33). This effect is likely to explain why a nonspecific inhibitor of iNOS was found to be detrimental in a clinical trial (34) and as illustrated by our experiments, where the bacterial burden was increased either after treatment of animals with L-NAME, an inhibitor of iNOS (12), or the induction of sepsis in iNOS^{-/-} mice.

A connection between MCP-1/CCL2 signaling and NO production has been established by previous observations. Murine peritoneal macrophages, upon activation with MCP-1/CCL2, show a dose- and time-dependent production of NO together with increased tumoricidal activity. L-NMMA (*N*-monomethyl-L-arginine), a specific inhibitor of NO production, inhibits the MCP-1/CCL2-induced NO secretion and macrophage-mediated tumoricidal activity (16). Consistent with this finding in anti-tumor assays, we observed by immunostaining that stimulation of macrophages with MCP-1/CCL2 and *E. coli* is able to induce an increase in iNOS expression. In contrast, stimulation of CCR2^{-/-} macrophages with LPS and IFN- γ failed to increase iNOS expression. Taken together, these findings demonstrate that MCP-1/CCL2 signaling is central to NO production by macrophages challenged by infectious stimuli to increase the expression of the inducible isoform of NOS.

The production of NO after stimulation of peritoneal macrophages with MCP-1/CCL2 was shown to occur via signal transduction cascades involving the participation of protein kinases, phosphatases, and the secondary messenger calcium (16). Our results extend this conclusion because we localized by immunofluorescence phosphorylated ERK and iNOS in macrophages stimulated with MCP-1/CCL2 in the presence of *E. coli*. Furthermore, we established functional relevance for ERK phosphorylation in this system; the ERK inhibitor U0126 decreased the intracellular production of NO while increasing the CFU counts in the supernatants of MCP-1/CCL2-stimulated cultured macrophages challenged with *E. coli*. These results indicate that the mechanism involved in MCP-1/CCL2 bacterial clearance is closely associated with the increased local release of NO, which is an important mediator for the death of microorganisms, and the signaling pathway involved in this mechanism is dependent on MAP kinases and, more specifically, an ERK signaling pathway. Although the protective effect of MCP-1/CCL2 has been established before (11, 25), this is an important new contribution to the understanding of the mechanism by which MCP-1/CCL2 exerts a protective role in septic syndromes.



The clinical importance of MCP-1/CCL2 in sepsis is still a matter of interest and debate. In previous studies, we demonstrated that MCP-1/CCL2 plays an important role in the survival of septic animals, by a mechanism based on the balance of inflammatory mediators. Several reports in the literature have shown that this balance is essential for the homeostasis to be restored after noxious stimulation, such as bacterial infection in septic syndromes. Clinical data obtained in septic patients by our group demonstrated a role for MCP-1/CCL2 as a biomarker to predict early mortality (<48 h). Monocyte chemoattractant protein 1/CCL2 levels showed the best accuracy for predicting 28-day mortality and were also associated with prognosis (35). With this new study, we are further reinforcing the importance of MCP-1/CCL2 in the pathophysiology of sepsis pointing to its central role in the elimination of microorganisms.

In summary, we demonstrated a crucial role of MCP-1/CCL2 in the clearance of bacteria by a mechanism that involves increased expression of iNOS and production of NO by ERK signaling pathways. The data further support the postulate that maintenance of a balance between proinflammatory and anti-inflammatory factors during sepsis is necessary for limiting tissue damage and maximizing beneficial infection control effects of inflammation in models of sepsis. This has also provided a novel mechanism through which MCP-1/CCL2 and NO participate in bacterial clearance in septic responses.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Claudia Benjamin and Dr. Willian A. Kuziel for CCR2 knockout animals, and Dr. Craig Gerard from the Children's Hospital (Harvard Medical School) for kindly providing MCP-1/CCL2 knockout mice and their backcrossed controls. They also thank Dr. Alan de Brito Carneiro for support in Western blot analysis and Dr. Adriana Vieira de Abreu for support in the immunolocalization protocol.

This work was supported by PAPES-FIOCRUZ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil). The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Dr. Zimmerman's research activities are in part supported by National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute award SR37WLO44525.

ABBREVIATIONS

CLP	cecal ligation and puncture
NOS	nitric oxide synthase
iNOS	induced nitric oxide synthase
L-NAME	L-NG-nitroarginine methyl ester

REFERENCES

1. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*. 2001; 29:S109–S116. [PubMed: 11445744]
2. Marshall JC. Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2:391–405. [PubMed: 12750742]
3. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002; 420:885–891. [PubMed: 12490963]
4. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002; 420:846–852. [PubMed: 12490957]
5. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:891–928. [PubMed: 15032599]
6. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol*. 2001; 2:108–115. [PubMed: 11175802]



7. Nakano Y, Kasahara T, Mukaida N, Ko YC, Nakano M, Matsushima K. Protection against lethal bacterial infection in mice by monocyte-chemotactic and -activating factor. *Infect Immun*. 1994; 62:377–383. [PubMed: 8300198]
8. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM, Kunkel SL. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol*. 1999; 163:6148–6154. [PubMed: 10570305]
9. Amano H, Morimoto K, Senba M, Wang H, Ishida Y, Kumatori A, Yoshimine H, Oishi K, Mukaida N, Nagatake T. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. *J Immunol*. 2004; 172:398–409. [PubMed: 14688348]
10. Gomes RN, Bozza FA, Amancio RT, Japiassu AM, Vianna RC, Laranjeira AP, Gouveia JM, Bastos MS, Zimmerman GA, Stafforini DM, et al. Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Shock*. 2006; 26:41–49. [PubMed: 16783197]
11. Gomes RN, Figueiredo RT, Bozza FA, Pacheco P, Amancio RT, Laranjeira AP, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Bozza MT. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock*. 2006; 26:457–463. [PubMed: 17047515]
12. Petros A, Lamb G, Leone A, Moncada S, Bennett D, Vallance P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res*. 1994; 28:34–39. [PubMed: 7509259]
13. Spain DA, Wilson MA, Bar-Natan MF, Garrison RN. Nitric oxide synthase inhibition aggravates intestinal microvascular vasoconstriction and hypoperfusion of bacteremia. *J Trauma*. 1994; 36:720–725. [PubMed: 7514673]
14. Moilanen E, Vapaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann Med*. 1995; 27:359–367. [PubMed: 7546626]
15. Tsai WC, Strieter RM, Zisman DA, Wilkowski JM, Bucknell KA, Chen GH, Standiford TJ. Nitric oxide is required for effective innate immunity against *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 1997; 65:1870–1875. [PubMed: 9125574]
16. Biswas SK, Sodhi A, Paul S. Regulation of nitric oxide production by murine peritoneal macrophages treated *in vitro* with chemokine monocyte chemo-attractant protein 1. *Nitric Oxide*. 2001; 5:566–579. [PubMed: 11730364]
17. Bossink AW, Paemen L, Jansen PM, Hack CE, Thijs LG, Van Damme J. Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood*. 1995; 86:3841–3847. [PubMed: 7579352]
18. Forslund T, Sundqvist T. Nitric oxide-releasing particles inhibit phagocytosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 233:492–495. [PubMed: 9144564]
19. Franchini A, Conte A, Ottaviani E. Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. *Adv Neuroimmunol*. 1995; 5:463–478. [PubMed: 8746517]
20. Moncada S. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand*. 1992; 145:201–227. [PubMed: 1381545]
21. Cross AS, Opal SM. A new paradigm for the treatment of sepsis: is it time to consider combination therapy? *Ann Intern Med*. 2003; 138:502–505. [PubMed: 12639085]
22. Gaieski DF, Mikkelsen ME, Band RA, Pines JM, Massone R, Furla FF, Shofer FS, Goyal M. Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. *Crit Care Med*. 2012; 38:1045–1053. [PubMed: 20048677]
23. Siddiqui S, Salahuddin N, Raza A, Razzak J. How early do antibiotics have to be to impact mortality in severe sepsis? A prospective, observational study from an emergency department. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2009; 21:106–110. [PubMed: 21067040]
24. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006; 354:610–621. [PubMed: 16467548]



25. Balamayooran G, Batra S, Balamayooran T, Cai S, Jeyaseelan S. Monocyte chemoattractant protein 1 regulates pulmonary host defense via neutrophil recruitment during *Escherichia coli* infection. *Infect Immun*. 2011; 79:2567–2577. [PubMed: 21518788]
26. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, Pamer EG. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2008; 180:6846–6853. [PubMed: 18453605]
27. Hauser B, Radermacher P, Thiemermann C, Matejovic M. Nitric oxide, bacteria, and host defense in sepsis: who needs what? *Shock*. 2004; 22:588–590. [PubMed: 15545834]
28. Beck PL, Xavier R, Wong J, Ezedi I, Mashimo H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK, Podolsky DK. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 286:G137–G147. [PubMed: 14665440]
29. Liew FY. Nitric oxide in infectious and autoimmune diseases. *Ciba Found Symp*. 1995; 195:234–239. discussion 239–244. [PubMed: 8724841]
30. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15:323–350. [PubMed: 9143691]
31. Vromen A, Arkovitz MS, Zingarelli B, Salzman AL, Garcia VF, Szabo C. Low-level expression and limited role for the inducible isoform of nitric oxide synthase in the vascular hyporeactivity and mortality associated with cecal ligation and puncture in the rat. *Shock*. 1996; 6:248–253. [PubMed: 8902940]
32. Kilbourn RG, Szabo C, Traber DL. Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibitors in circulatory shock: lessons learned from experimental and clinical studies. *Shock*. 1997; 7:235–246. [PubMed: 9110408]
33. Linares E, Giorgio S, Mortara RA, Santos CX, Yamada AT, Augusto O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms *in vivo* revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30:1234–1242. [PubMed: 11368921]
34. Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D, et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2004; 32:21–30. [PubMed: 14707556]
35. Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*. 2007; 11:R49. [PubMed: 17448250]

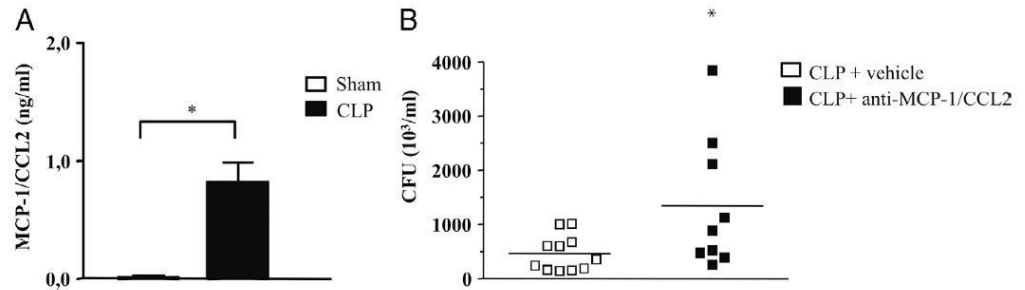


Fig. 1. Monocyte chemoattractant protein 1/CCL2 levels are increased and are important for the control of bacterial burden *in vivo*

A, Swiss mice were submitted to the CLP procedure, and 6 h later, the peritoneal lavage fluid was obtained and used for MCP-1/CCL2 determination by enzyme-linked immunosorbent assay. A group of sham-operated animals was used as the control. Each bar is the mean \pm SEM from six animals. B, Swiss mice were treated with anti-MCP-1/CCL2 monoclonal antibody (10 ng/kg) 1 h after undergoing CLP. Six hours later, the peritoneal fluid was obtained, plated on tryptic soy agar medium (TSA) plates, and incubated overnight at 37°C for CFU counting. *Statistically significant differences when compared with sham-operated group.



Gomes et al.

Page 13

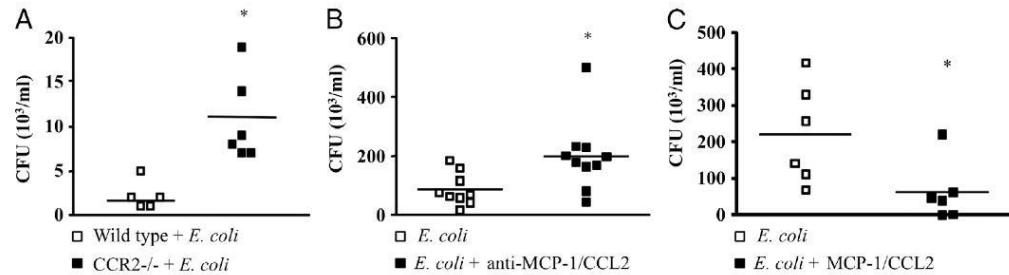


Fig. 2. Monocyte chemoattractant protein 1/CCL2 is important for the control of bacterial burden in *in vivo* and *in vitro* models of gram-negative infection

A, CCR2^{-/-} mice were injected intraperitoneally with *E. coli* (10^5 bacteria/animal), and 6 h later, the peritoneal fluid was obtained and plated on plates and incubated overnight at 37°C for CFU counting. B, Peritoneal macrophages (10^6 /well) from Swiss mice were incubated with anti-MCP-1/CCL2 monoclonal antibody (10 ng/mL) and 1 h later challenged with *E. coli* (10^5 bacteria/mL). C, Peritoneal macrophages (10^6 /well) from Swiss mice were incubated with recombinant MCP-1/CCL2 (100 ng/mL) and 1 h later challenged with *E. coli* (10^5 bacteria/mL). After 30 min, the culture supernatant was collected in B and C and plated in TSA plates for CFU counting. Each figure represents one experiment out of three repetitions with similar results. Each square represents one well, and the horizontal lines represent the mean. *Statistically significant difference, $P \leq 0.05$ (Student *t* test).

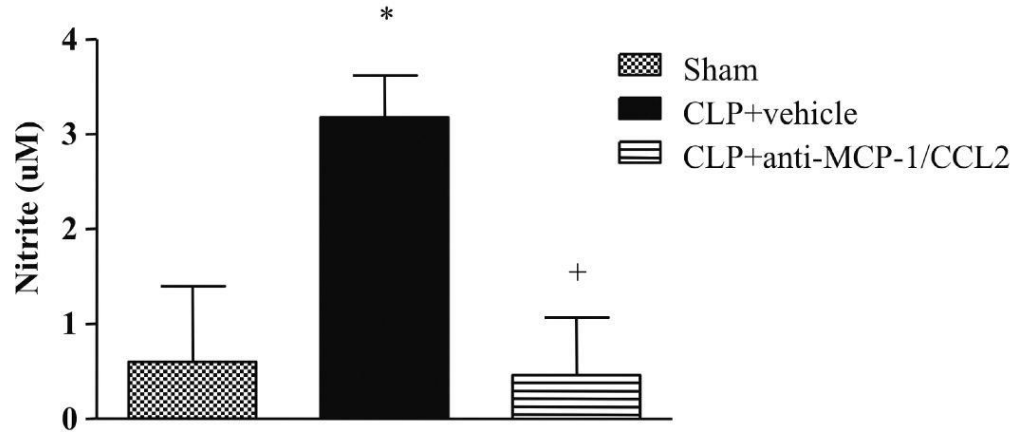


Fig. 3. Monocyte chemoattractant protein 1/CCL2 is involved in NO production after CLP-induced sepsis
Nitrite levels in the peritoneal cavity 6 h after sham or CLP surgery in Swiss mice treated with anti-MCP-1/CCL2 monoclonal antibody (250 µg/kg) or vehicle. The peritoneal fluid was collected and used to measure nitrite levels by the Griess method. Each bar is the mean ± SEM from six animals in sham and nine animals in CLP + vehicle and CLP + anti-MCP-1/CCL2. +Statistically significant differences from CLP + vehicle group; *statistically significant differences between CLP + vehicle and sham-operated group, with a $P \leq 0.05$ (Student *t* test).



Gomes et al.

Page 15

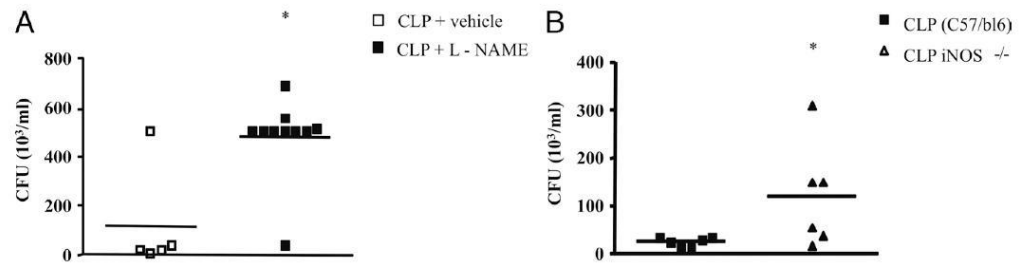


Fig. 4. Nitric oxide is an effector molecule for bacterial killing in CLP-induced sepsis

A, The Swiss mice were submitted to CLP and treated with L-NAME (20 mg/kg i.p.) 2 h later. After 6 h, the animals were killed, and the peritoneal fluid was collected, plated on TSA plates, and incubated at 37°C for CFU counting. B, Inducible NOS-deficient mice were submitted to CLP, and after 6 h, the peritoneal fluid was collected for CFU counting as described above. Each square represents one animal in the experimental group with the mean value represented by a horizontal line. The figures represent one experiment out of two repetitions with similar results. *Statistically significant difference, with a $P \leq 0.05$ (Student *t* test).

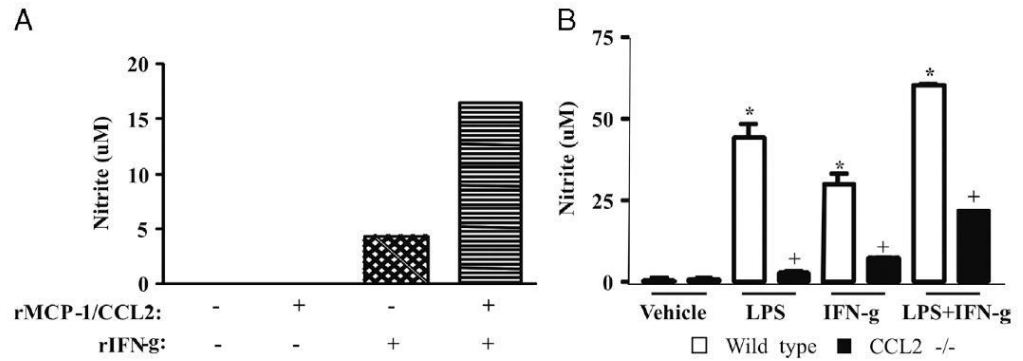


Fig. 5. Monocyte chemoattractant protein 1/CCL2 and IFN- γ induce NO production in cultured peritoneal macrophages

A, Peritoneal macrophages (10^6 cells/well) were incubated with rMCP-1/CCL2 (100 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL), or both. After 24 h, the culture supernatants were obtained for determination of nitrite levels by Griess. The figure represents one experiment out of three repetitions with similar results, and the bars are the mean of duplicate wells. B, Peritoneal macrophages (10^6 cells/well) from CCL2^{-/-} mice were incubated with LPS (50 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL), or both. Each bar is the mean \pm SEM of six wells. This is a representative experiment out of two repetitions with similar results. *Statistically significant difference when compared with macrophages incubated with vehicle ($P \leq 0.005$). +Statistically significant difference when compared with stimulated macrophages obtained from WT animals ($P \leq 0.005$).

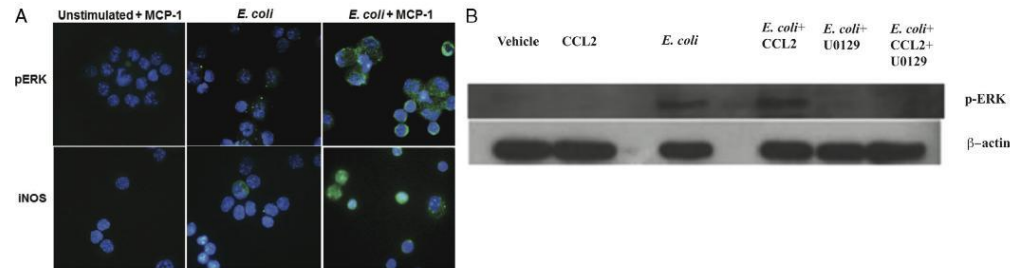


Fig. 6. Monocyte chemoattractant protein 1/CCL2 primes macrophages for enhanced expression of iNOS and phosphorylation of ERK

A, Peritoneal macrophages were obtained and plated in 24-well culture plates (10^6 cells/well). Cells were then incubated with MCP-1/CCL2 (100 ng/mL) or vehicle and after 30 min challenged with *E. coli* (10^5 bacteria/mL) or vehicle. After 1 h, the cells were recovered and cytospun onto glass slides, fixed with 3.7% formaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100. Immunostaining with specific antibodies was performed as described in Materials and Methods, and the slides were observed under phase-contrast and fluorescent microscopy. B, Western blot analysis of pERK in macrophages stimulated with MCP-1/CCL2 and *E. coli*. Thioglycollate peritoneal macrophages were obtained and plated in 24-well culture plates (10^6 cells/well). Cells were then incubated with U0126 (13 μ M) for 15 min followed by incubation with MCP-1/CCL2 (100 ng/mL) or vehicle for 30 min before they were challenged with *E. coli* (10^5 bacteria/mL) or vehicle. After 1 h, the cells were recovered and lysed in lysis buffer. The lysate was blotted in a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel. Each experiment shown is representative of two repetitions with similar results.



ANEXO IV

OPEN ACCESS Freely available online



Bacterial Clearance Is Improved in Septic Mice by Platelet-Activating Factor-Acetylhydrolase (PAF-AH) Administration

Mariana G. A. Teixeira-da-Cunha¹, Rachel N. Gomes^{1,2*}, Nathassia Roehrs¹, Fernando A. Bozza², Stephen M. Prescott³, Diana Stafforini⁴, Guy A. Zimmerman⁵, Patricia T. Bozza¹, Hugo C. Castro-Faria-Neto¹

1 Laboratório De Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, Brazil, **2** Laboratório de Investigação em Medicina Intensiva, IPEC, Fiocruz, RJ, Brazil, **3** Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, United States of America, **4** Huntsman Cancer Institute, Salt Lake City, Utah, United States of America, **5** Program in Human Molecular Biology and Genetics, University of Utah, Salt Lake City, Utah, United States of America

Abstract

Current evidence indicates that dysregulation of the host inflammatory response to infectious agents is central to the mortality of patients with sepsis. Strategies to block inflammatory mediators such as PAF have been investigated as adjuvant therapies for sepsis. PAF-AH, the enzyme responsible for PAF degradation, showed positive results in pre-clinical studies and phase II clinical trials, but the results of a phase III study were disappointing. In this study, we investigated the potential protective mechanism of PAF-AH in sepsis using the murine model of cecal ligation and puncture (CLP). Treatment with rPAF-AH increased peritoneal fluid levels of the anti-inflammatory mediators MCP-1/CCL2 after CLP. The numbers of bacteria (CFU) in the peritoneal cavity were decreased in the rPAF-AH-treated group, indicating more efficient bacterial clearance after rPAF-AH treatment. Interestingly, we observed increased levels of nitric oxide (NO) after PAF-AH administration, and rPAF-AH treatment did not decrease CFU numbers either in iNOS-deficient mice or in CCR2-deficient mice. We concluded that administration of exogenous rPAF-AH reduced inflammatory injury, altered cytokine levels and favored bacterial clearance with a clear impact on mortality through modulation of MCP-1/CCL2 and NO levels in a clinically relevant sepsis model.

Citation: Teixeira-da-Cunha MGA, Gomes RN, Roehrs N, Bozza FA, Prescott SM, et al. (2013) Bacterial Clearance Is Improved in Septic Mice by Platelet-Activating Factor-Acetylhydrolase (PAF-AH) Administration. PLoS ONE 8(9): e74567. doi:10.1371/journal.pone.0074567

Editor: Jane C. Deng, University of California Los Angeles, United States of America

Received: December 30, 2012; **Accepted:** August 5, 2013; **Published:** September 12, 2013

Copyright: © 2013 Teixeira-da-Cunha et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by PAPES-FIOCRUZ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rachelngomes@gmail.com

Introduction

Sepsis is a major cause of death worldwide. Approximately 750,000 cases of sepsis occur annually in the USA, with a mortality rate of 28.6% [1,2]. The rates of sepsis are increasing in hospitals worldwide. Using the US National Hospital Discharge Survey database, Martin et al. [3] reported an increase in the frequency of severe sepsis from 83 cases per 100,000 population in 1979 to 240 cases per 100,000 population in 2000.

Several studies have demonstrated the involvement of lipid mediators, such as platelet-activating factor (PAF), in a variety of human inflammatory syndromes and in animal models of diseases [4,5]. High levels of PAF were found in plasma and tissues of animals subjected to animal models of sepsis as well as in patients with sepsis [5–8]. Circulating levels of endogenous PAF are controlled by PAF-acetylhydrolase (PAF-AH), which is a highly specific phospholipase that hydrolyzes the *sn*-2 acyl group of PAF and structurally related phospholipids, terminating their signals and thus regulating inflammatory responses [9,10]. The anti-inflammatory properties of recombinant PAF-AH (rPAF-AH) in animal models were first shown after its cloning from human

macrophages [11]. Clinical conditions of excessive inflammation leading to multiple organ failure are associated with suppressed levels of PAF-AH in the circulation and may explain the unchecked PAF activity and excessive inflammation in septic states [12]. In pre-clinical studies developed by our group, we observed that sepsis induced a significant decrease in plasma PAF-AH activity, and this effect correlated with the mortality of the animals subjected to endotoxemia and a clinically relevant model of sepsis, the cecal ligation and puncture (CLP) [13]. The effect of PAF-AH in clinical studies, however, is contradictory. Treatment with rPAF-AH resulted in positive effects on survival in a Phase II study with patients with sepsis or multiple traumas [14]. However, a Phase III trial failed to confirm this benefit [15]. The reasons for the difference in the Phase II and Phase III results remain to be determined and likely involve the multiple challenges inherent to sepsis trials.

In the present work, we further investigated the protective effect of rPAF-AH on animal models of sepsis, emphasizing the bacterial clearance and the mediators involved in this phenomenon. We have previously shown that PAF-AH treatment protects mice from polymicrobial sepsis, and this protective effect is accompanied by



an increase in MCP-1 levels and is dependent on CCR2 signaling [13]. More recently, we have observed that MCP-1/CCL2 is important for optimal bacterial elimination, and this mechanism involves the release of nitric oxide, which is an important antimicrobial agent. The molecular pathway connecting an increase in MCP-1 levels with increased NO production, and therefore increased killing capacity, involves ERK activation [16]. Here, we show that administration of rPAF-AH alters cytokine levels and favors bacterial clearance through the modulation of MCP-1/CCL2 and NO levels.

Materials and Methods

Animals

Swiss and C57BL/6 male mice weighing 20 to 25 g, age 6–8 weeks, from the Oswaldo Cruz Foundation breeding unit were used. The animals were maintained at a constant temperature (25°C) with free access to chow and water in a room with a 12-h light/dark cycle. In one set of experiments, MCP-1/CCL2 receptor-deficient mice (CCR2^{-/-}) or inducible nitric oxide synthase-deficient mice (iNOS^{-/-}), in a C57BL/6 background, were used. This study was approved by the committee of animal use (CEUA), Oswaldo Cruz Foundation, with the license number LW-36/10.

Materials

Human rPAF-AH (Pafase@) was provided by ICOS Corporation (Bothell, WA, USA) as an endotoxin free solution. PAF and SR27417 were from Sigma-Aldrich (USA), and Lyso-PAF was from Cayman Chemical (Michigan-USA). Murine recombinant MCP-1 was from Peprotech (Rocky Hill, NJ). Griess reagent was from Sigma-Aldrich (USA). Thiopental (Thionembatal) was from Abott Labs. do Brasil, LTDA, and ketamine were from Cristália (Brazil).

Cecal Ligation and Puncture (CLP)

Mice were anesthetized with a mixture of Thiopental (40 mg/kg) and Ketamine (80 mg/kg) diluted in sterile saline and administered intraperitoneally (0.2 ml). Laparotomy was performed, and the cecum was exposed and carefully ligated below the ileocecal junction with care to avoid bowel obstruction. The cecum was punctured once with an 18-gauge needle and then gently squeezed to empty its contents through the puncture. The cecum was returned to the peritoneal cavity, and the abdominal muscle and skin incisions were closed in layers using a 3-0 nylon suture line. Immediately after the surgery, 0.5 ml of sterile saline was administered subcutaneously to the animals for volume resuscitation. Sham-operated mice were subjected to identical procedures except that ligation and puncture of the cecum were omitted. Animals subjected to CLP developed early signs of sepsis, including lethargy, piloerection, and diarrhea. Survival of mice subjected to CLP or sham injury was determined daily for 7 days. For the experiments with rPAF-AH, the animals were treated with 1 mg/kg (i.p.) of the enzyme fifteen minutes after the CLP procedure.

Bacteria Inoculation

Mice were stimulated intraperitoneally with *S. Typhimurium* (5×10^5 bact/cavity) or *E. coli* (10^6 bact/cavity). For these experiments, the *E. coli* ATCC25922 strain was grown in LB medium (10 g of bactotripton, 5 g of yeast extract and 10 g of NaCl, pH 7, sterilized by autoclaving at 120°C for 30 min.) from a single colony. For studies of *Salmonella* infection, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ISC 5302/2004, a generous gift from the

Department of Microbiology of the Instituto Oswaldo Cruz, were cultured in Luria-Bertani broth (Guria Broth Miller; Sigma-Aldrich) for 16–18 h at 37°C to obtain stationary growth phase cultures. The bacteria were then centrifuged (200 rpm) for 10 min at 4°C, and the pellets were resuspended in PBS to an OD of 0.1 at 660 nm, corresponding to 10^8 CFU/ml. The animals were treated with 1 mg/kg (i.p.) of rPAF-AH fifteen minutes after bacterial stimulation. After 6 hours, the peritoneal cavity was washed, and the lavage fluid was collected for determination of CFU and NO levels.

MCP-1/CCL2 Measurement

The levels of MCP-1/CCL2 were evaluated using an ELISA method. Mice were killed in a carbon dioxide chamber at designated time points, and the peritoneal cavity was opened and rinsed with 3 ml of PBS solution. The supernatant fractions were used for immunoassays. All measurements were performed in duplicate following the manufacturer's instructions (R&D systems Duo set kit).

Determination of CFU

Twelve microliters of peritoneal lavage fluid from each mouse were placed on ice and serially diluted with sterile saline. Twelve microliters of each dilution were plated on agar plates and incubated overnight at 37°C after which the number of colonies was counted.

Nitric Oxide Measurements

Mice were euthanized in a CO₂ chamber at designated time points, and the peritoneal cavity was opened and rinsed with 3 ml of PBS. The peritoneal fluid or supernatant of the cell culture was collected and centrifuged for determination of nitrite levels using Griess reagent according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich).

Isolation of Peritoneal Macrophages

Peritoneal macrophages were obtained after washing the peritoneal cavity with 3 ml of PBS. One million cells were distributed on culture plates and placed into a 37°C CO₂ incubator for 2 h. All nonadherent cells were subsequently removed, and the adherent cells were treated with rMCP-1/CCL2 (100 ng/ml) or rPAF-AH (0.025 mg/well) and stimulated with *E. coli* (10^7 bact./well). After 1 hour of *E. coli* stimulation, the supernatant was obtained and used for nitrite determination by the Griess assay as described above.

Statistical Analysis

Data were analyzed statistically using the unpaired t-test with the Graph Pad Prism software. Data were considered statistically significant if *P* values were less than 0.05.

Results

Treatment with PAF-AH Increases Bacterial Clearance in the Peritoneal Cavity of Animals Subjected to CLP or Inoculated with *Salmonella Typhimurium*

Previous studies demonstrated that administration of rPAF-AH (1 mg/kg) 15 min or 6 h after CLP increased the survival rate and reduced the inflammatory response [13]. To investigate the mechanisms involved in this protective effect, we examined the numbers of bacterial colony forming units (CFU) in the peritoneal cavity of the animals after treatment in different models of sepsis. As shown in Figures 1A and B, CFU numbers were significantly



diminished in PAF-AH-treated groups 6 and 24 hours after the CLP procedure. Because CLP is a polymicrobial model of sepsis, we investigated if rPAF-AH would increase bacterial clearance in a model of Gram-negative sepsis induced by intraperitoneal injection of *S. Typhimurium* or *E. coli*. As shown in Figures 2A and B, rPAF-AH treatment decreased CFU numbers in both models of bacterial infection.

To investigate a direct anti-bacterial effect of rPAF-AH, we incubated *S. Typhimurium* or *E. coli* with rPAF-AH in the absence of host cells. We observed that incubation with rPAF-AH did not affect bacterial growth of *S. Typhimurium* (721.3 ± 20.9 -vehicle versus 731.0 ± 29.7 -PAF-AH group) or *E. coli* (344.8 ± 144.0 -vehicle versus 259.0 ± 131.7 -PAF-AH group). Similar results were observed when we investigated the direct effect of rPAF-AH on Gram-positive bacteria *S. aureus* (344.8 ± 144.0 -vehicle versus 259.0 ± 131.7 -PAF-AH group). The hydrolysis of PAF by PAF-AH releases the biologically inactive PAF metabolite, lyso-PAF. Therefore, we investigated if PAF or lyso-PAF had any direct effect on bacterial growth. We observed no difference in the CFU number after incubation of *S. Typhimurium* with PAF or lyso-PAF (539.1 ± 62.5 -vehicle versus 505.2 ± 19.7 -PAF versus 491.0 ± 29.1 -Lyso-PAF group).

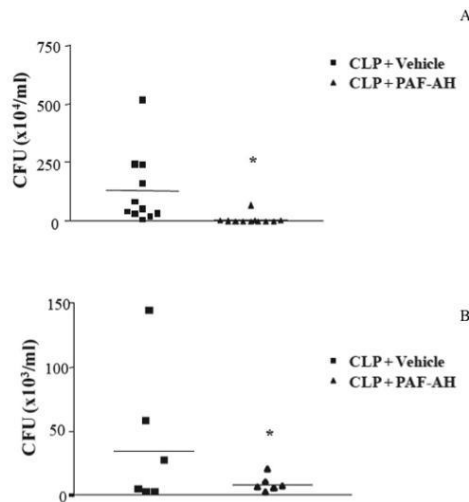


Figure 1. Treatment with rPAF-AH decreases CFU numbers in the peritoneal fluid after CLP model. (A) Mice subjected to CLP were treated with rPAF-AH (1 mg/kg-i.p. 15 minutes after). At 6 h after CLP, the mice were euthanized, and the peritoneal fluid was collected and plated on agar plates. (B) At 24 h after CLP, mice were euthanized, and the peritoneal fluid was collected and plated on agar plates. After infection, mice were euthanized 6 (CLP+Vehicle n=11 animals; CLP+PAF-AH n=10) and 24 (CLP+Vehicle n=6 animals; CLP+PAF-AH n=6) hours after infection, and the peritoneal fluid was collected. Twelve microliters of the peritoneal fluid from each mouse were serially diluted and plated on agar plates. The data represent three different experiments, and the horizontal line represents the median of CFU count. (*) indicate significant difference ($P=0.05$) when compared to vehicle treatment.
doi:10.1371/journal.pone.0074567.g001

Treatment with rPAF-AH Increases the Production of MCP-1/CCL2 and Nitric Oxide in Septic Mice

To analyze the mediators involved in bacterial clearance, we measured the MCP-1/CCL2 and nitric oxide (NO) levels in the peritoneal cavity of the animals 6 hours after CLP. Several studies have demonstrated the involvement of NO as a bactericide substance and its central role in phagocytosis [17–21]. As shown in Figures 3A and B, treatment of septic mice with rPAF-AH significantly increased MCP-1/CCL2 and NO levels in the peritoneal fluid of treated mice compared to the control. We next used mice deficient in inducible nitric oxide synthase (iNOS^{-/-}) to assess if NO was involved in rPAF-AH-induced bacterial clearance. We found that administration of rPAF-AH to iNOS^{-/-} mice failed to reduce the CFU numbers when compared to the vehicle-treated group. The CFU numbers were significantly higher in rPAF-AH-treated iNOS^{-/-} mice than in wild-type mice, further reinforcing the role of NO in controlling bacterial clearance in the model (Figure 4A).

MCP-1/CCL2 Levels are Relevant to NO Production and Increased Bacterial Clearance after Treatment with rPAF-AH

We have previously demonstrated that rPAF-AH treatment alters the cytokine/chemokine profile in sepsis [13]. We hypothesized that these changes in the cytokine/chemokine profile, specifically increased MCP-1 levels, would favor bacterial clearance by the host. Here we confirmed that treatment with rPAF-AH increased MCP-1 levels in the peritoneal fluid 6 hours after CLP. Nakano et al. have demonstrated that treatment with MCP-1 protected the animals from mortality induced by *P. aeruginosa* by increasing the bacterial clearance [22]. To investigate if increased MCP-1/CCL2 levels would be important for more efficient clearance of bacteria after rPAF-AH treatment, we performed CLP in MCP-1/CCL2 receptor-deficient mice (CCR2^{-/-}). As observed in iNOS^{-/-} mice, we found that rPAF-AH treatment did not affect CFU numbers in CCR2^{-/-} mice (Figure 4B). Interestingly, treatment with rPAF-AH did not increase survival in CCR2^{-/-} mice (data not shown) [13]. To investigate a direct anti-bacterial effect of MCP-1/CCL2, we incubated *E. coli* with MCP-1/CCL2 in the absence of host cells. We observed that incubation with MCP-1/CCL2 did not affect *E. coli* bacterial growth (372 ± 44.2 -*E.coli*+vehicle versus 400 ± 42.5 -*E.coli*+MCP-1).

To further demonstrate the interaction between MCP-1/CCL2 and NO, we showed that MCP-1/CCL2 and PAF-AH had an additional effect on NO production when peritoneal macrophages were stimulated with *E. coli* (Figure 5). Altogether, these results indicate that the increase in MCP-1/CCL2 and NO levels induced by the treatment of septic mice with rPAF-AH leads to a more efficient bacterial clearance at the site of infection and therefore impacts the beneficial effects of this enzyme in septic conditions.

Discussion

The killing of infectious agents is an essential component of the first-line host defense and a central mechanism in the host immune innate response against pathogens [23,24]. The importance of this phenomenon in the development of sepsis has been clearly demonstrated [25,26]. In the present study, we characterized a previously unknown effect of PAF-acetylhydrolase in bacterial clearance in a clinically relevant model of sepsis. Previous studies from our laboratory have shown that rPAF-AH treatment protects animals from sepsis, modifies cytokine levels and decreases leukocyte accumulation and activation. Although the precise

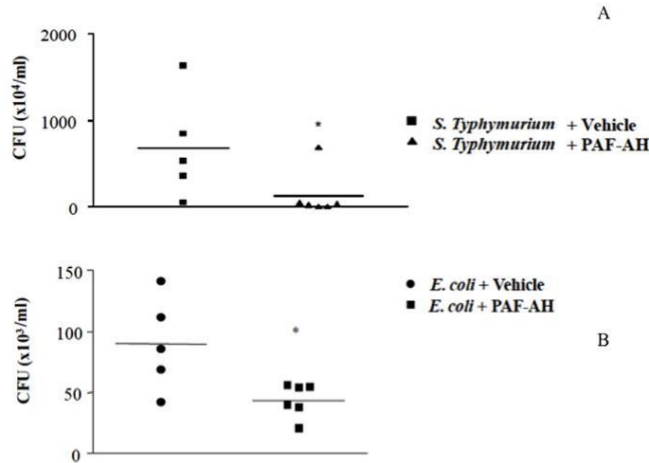


Figure 2. Treatment with rPAF-AH decreases CFU numbers in the peritoneal fluid after *S. Typhimurium* or *E. coli* administration. (A) Mice injected with *S. Typhimurium* (5×10^7) were treated with rPAF-AH (1 mg/kg-i.p. 15 minutes after - *S. Typhimurium*+Vehicle n=5 animals; *S. Typhimurium*+PAF-AH n=6). (B) Mice injected with *E. coli* (10^8) were treated with rPAF-AH (1 mg/kg-i.p. 15 minutes after- *E. coli*+Vehicle n=5 animals; *E. coli* +PAF-AH n=4). Six hours after infection, the mice were euthanized, and the peritoneal fluid was collected. Twelve microliters of the peritoneal fluid from each mouse were serially diluted and plated on agar plates. The data represent three different experiments, and the horizontal line represents the median of CFU count. (*) indicate significant difference ($P=0.05$) when compared to vehicle treatment. doi:10.1371/journal.pone.0074567.g002

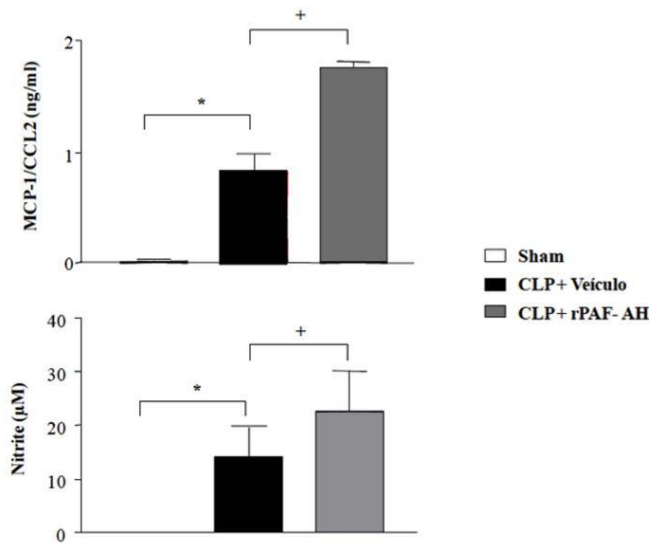


Figure 3. Treatment with rPAF-AH increases MCP-1/CCL2 and NO levels in the peritoneal cavity after CLP. Swiss mice were injected intraperitoneally with rPAF-AH (1 mg/kg) or vehicle 15 min after the CLP procedure (n=6 in all groups). After 6 h, the peritoneal fluid was obtained and used for MCP-1/CCL2 (A) or NO (B) determination by ELISA and Griess assays, respectively. The values are the mean \pm SEM from 6 animals. (*) Statistically significant differences when compared to Sham group. (+) Statistically significant differences when compared to CLP+vehicle group. doi:10.1371/journal.pone.0074567.g003

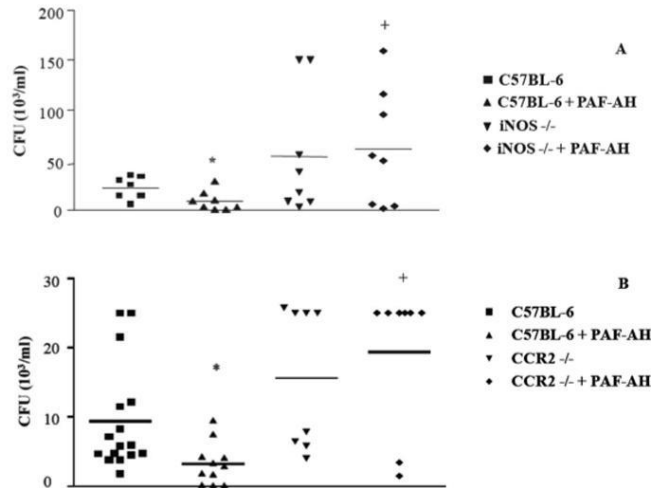


Figure 4. CFU numbers are not affected by rPAF-AH treatment in MCP-1/CCR2-deficient mice (CCR2^{-/-}) or iNOS-deficient mice (iNOS^{-/-}) subjected to CLP. Mice were treated with rPAF-AH (1 mg/kg i.p. - minimum of 7 animals in each group) 15 min after CLP. At 6 h, the mice were euthanized, and the peritoneal fluid was plated on agar plates. The data represent three different experiments, and the horizontal line represents the median of CFU count. (*) Statistically significant differences when compared with C57BL-6 group. (+) Statistically significant differences when compared with C57BL-6+PAF-AH group.
 doi:10.1371/journal.pone.0074567.g004

molecular mechanism for this protective effect is not completely understood, our previous study suggests the involvement of the chemokine MCP-1/CCL2 [13].

PAF signaling influences bacterial clearance in different models. Moreno et al. (2006) demonstrated an improvement of bacterial clearance and a reduction of the systemic spread of bacteria after treatment with the PAF receptor antagonist PCA-4248 in mice subjected to CLP [27]. In addition, treatment with another PAF receptor antagonist, WEB2170, induced protection with more

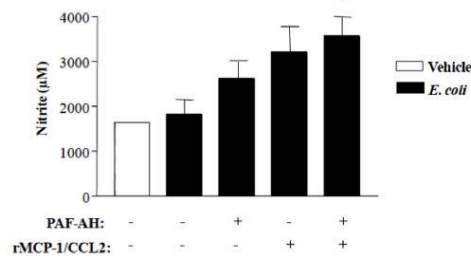


Figure 5. rPAF-AH and MCP-1/CCL2 increase NO production by peritoneal macrophages stimulated with *E. coli*. Peritoneal macrophages (10^6 cells/well) were incubated with rMCP-1 (100 ng/ml), PAF-AH (0,025 mg/well) or rMCP-1+PAF-AH and stimulated with *E. coli* (10^5 bact./well). After 1 hour of *E. coli* stimulation, the supernatant was obtained and used for nitrite determination by the Griess assay. The values are the mean \pm SEM from 4 wells. The data represent two different experiments. (*) Statistically significant differences when compared with *E. coli* group (P=0.030).
 doi:10.1371/journal.pone.0074567.g005

effective bacterial clearance in the lungs of mice infected with *Klebsiella pneumoniae* [28]. Studies with PAF receptor-deficient mice (PAFR^{-/-}) demonstrated that deficient PAFR signaling is associated with protection against lethal pneumonia, attenuated bacterial growth in the lungs and diminished dissemination of the infection after infection with *S. pneumoniae* [29]. Our observations that rPAF-AH treatment decreases CFU count numbers in animals subjected to CLP or inoculated with *Salmonella* Typhimurium further indicate that decreasing PAF signaling modulates innate responses to improve bacterial killing in septic conditions. A direct effect of rPAF-AH in bacterial growth and/or viability, although unlikely, could explain our observations in the CLP or *S. Typhimurium* model. Nevertheless, the results from incubating *S. Typhimurium*, *E. coli* or *S. aureus* (data not shown) with rPAF-AH *in vitro* completely eliminated this possibility. A polymicrobial infection and a Gram-negative infection (*S. Typhimurium*) were similarly affected by treatment with rPAF-AH, indicating a specific effect restricted to one or few bacterial species and that the increase in bacterial clearance induced by rPAF-AH is a more general process involving basic innate immune response pathways.

PAF is an early mediator of inflammatory syndromes, such as sepsis, that can influence cytokine response and cell behavior [30,31]. In a previous study, we measured the cytokine profile in the peritoneal fluid of mice subjected to CLP after treatment with rPAF-AH. We observed that rPAF-AH treatment decreased the levels of KC, IL-6, TNF and MIF while it increased the levels of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and MCP-1/CCL2 [13]. MCP-1/CCL2 has a protective effect in murine endotoxemia [32], and administration of blocking monoclonal antibodies [33] or genetic deficiency of MCP-1/CCL2 is associated with increased mortality rates in mice with sepsis [34]. Increased levels of MCP-1/CCL2 after rPAF-AH treatment in septic mice are associated with decreased mortality and, in fact, rPAF-AH failed



to decrease mortality in animals that were genetically deficient in the MCP-1/CCL2 receptor (CCR2^{-/-}) [13]. The precise molecular mechanism for this protective effect is not completely understood; however, in the present investigation, we postulated that changes in the cytokine/chemokine profile, especially MCP-1 levels, modulated innate responses to favor bacterial clearance and hence control infection. We found evidence to support this hypothesis because CFU numbers were decreased in the peritoneal fluid of mice subjected to CLP or challenged with *S. Typhimurium* and treated with rPAF-AH, while this effect was abrogated in CCR2^{-/-} mice.

Nitric oxide (NO) has numerous physiological and pathophysiological actions, including both pro-inflammatory and anti-inflammatory properties depending on the phase of the inflammatory reaction and the cellular population responsible for its production [35]. In addition, NO plays a crucial role in killing pathogens including Gram-positive and Gram-negative bacteria [20,21,36–38]. In fact, iNOS^{-/-} mice are more susceptible to CLP due to their inability to control the growth of bacteria at the infection site [39]. We measured the levels of NO in the peritoneal fluid of mice submitted to CLP and treated with rPAF-AH and observed increased levels when compared to controls, suggesting that the increased bacterial clearance after rPAF-AH treatment resulted from increased NO production under this condition. Confirming that NO is involved in microbicidal activity, the treatment with rPAF-AH was not effective in reducing bacterial CFU in the peritoneal fluid after CLP in iNOS^{-/-} mice.

Several studies indicate the involvement of MCP-1/CCL2 in bacterial clearance. For instance, pretreatment of mice with anti-MCP-1/CCL2 increased the lethality rate and was associated with impaired bacterial clearance in a model of peritoneal sepsis [33]. In addition, treatment with rMCP-1/CCL2 increased bacterial clearance and protected mice after infection with *Pseudomonas aeruginosa* or *Salmonella Typhimurium* [22]. MCP-1/CCL2-deficient mice infected with *Salmonella Typhimurium* showed increased mortality and bacterial dissemination, characterized by pathogens in the liver and spleen [40]. Our results concur with these studies because rPAF-AH treatment increased bacterial clearance in parallel with an increase in MCP-1 levels but failed in CCR2^{-/-} mice. This finding suggests an important role for MCP-1/CCL2

and its signaling through CCR2 in the control of bacterial burden during infection.

Cytokines influence the production of NO by leukocytes through modulating the expression of iNOS [41]. NO and MCP-1 co-regulation in a number of endotoxin-activated cells, including macrophages, has been investigated. Experiments demonstrated that LPS-induced production of the CC chemokines MCP-1 and MIP-1 was NO dependent [42]. In another study, murine macrophages activated with rGPI-mucin in the presence of IFN- γ produced large quantities of NO and CCL2. On the other hand, MCP-1 exerts a number of effects via the increase or decrease in the production of NO by activated cells [43,44]. For instance, MCP-1/CCL2 contributes to the production of NO by macrophages infected with *T. cruzi* and hence to the microbiostatic activity of activated macrophages [45]. Our results show that synergism for NO production was also observed when macrophages stimulated with *E. coli* were treated with rPAF-AH and MCP-1, which correlated with better bacterial killing by macrophages.

Our results identify, for the first time, a fundamental role for rPAF-AH treatment in bacterial clearance, which may contribute to the beneficial effect of this enzyme observed in sepsis models [13] and in defined conditions in the clinical setting (21). In addition, we identified a synergistic mechanism involving MCP-1 and NO production that is under control of PAF signaling, and therefore affected by rPAF-AH treatment, and bolsters the ability of macrophages to kill invading bacteria. These findings may lead to additional discussion about the therapeutic potential of rPAF-AH in patients with sepsis.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Claudia Benjamin and Dr. William A. Kuziel for CCR2 knockout animals and their backcrossed controls.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RNG GAZ FAB PB SP DS HCCFN. Performed the experiments: MGATC RNG NR. Analyzed the data: RNG FAB PTB HCCFN. Contributed reagents/materials/analysis tools: PTB HCCFN. Wrote the paper: RNG GAZ HCCFN.

References

1. Angus DC, Wax RS (2001) Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 29: S109–116.
2. Marshall JC (2003) Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis. *Nat Rev Drug Discov* 2: 391–405.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348: 1546–1554.
4. Souza DG, Pinho V, Soares AC, Shimizu T, Ishii S, et al. (2003) Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *Br J Pharmacol* 139: 733–740.
5. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM (2002) The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 30: S294–301.
6. Chang SW, Feddersen CO, Henson PM, Voelkel NF (1987) Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 79: 1498–1509.
7. Inaizumi TA, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, et al. (1995) Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* 238: 5–20.
8. Mozes T, Heiligers JP, Tak CJ, Zijlstra FJ, Ben-Efraim S, et al. (1991) Platelet activating factor is one of the mediators involved in endotoxic shock in pigs. *J Lipid Mediat* 4: 309–325.
9. Karasawa K (2006) Clinical aspects of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1761: 1359–1372.
10. Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM (1987) Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties. *J Biol Chem* 262: 4223–4230.
11. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, et al. (1995) Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 374: 549–553.
12. Narahara H, Nishioka Y, Johnston JM (1993) Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1258–1262.
13. Gomes RN, Bozza FA, Amancio RT, Japiassu AM, Vianna RC, et al. (2006) Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Shock* 20: 41–49.
14. Schuster DP, Metzler M, Opal S, Lowry S, Balk R, et al. (2003) Recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase to prevent acute respiratory distress syndrome and mortality in severe sepsis: Phase IIb, multicenter, randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Crit Care Med* 31: 1612–1619.
15. Opal S, Laterre PF, Abraham E, Francois B, Wittebole X, et al. (2004) Recombinant human platelet-activating factor acetylhydrolase for treatment of severe sepsis: results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Crit Care Med* 32: 332–341.
16. Gomes RN, Teixeira-Canha MG, Figueiredo RT, Almeida PE, Alves SC, et al. (2013) Bacterial clearance in septic mice is modulated by MCP-1/CCL2 and nitric oxide. *Shock* 39: 63–69.
17. Forslund T, Sundqvist T (1997) Nitric oxide-releasing particles inhibit phagocytosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 492–495.
18. Franchini A, Conte A, Ottaviani E (1995) Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. *Adv Neuroimmunol* 5: 463–478.
19. Gerra G, Caccavari R, Fontanesi B, Fertomani Affini G, Maestri D, et al. (1995) Naloxone and metergoline effects on growth hormone response to gamma-hydroxybutyric acid. *Int Clin Psychopharmacol* 10: 245–250.



20. Hauser B, Radermacher P, Thiemermann C, Matejovic M (2004) Nitric oxide, bacteria, and host defense in sepsis: who needs what? *Shock* 22: 589–590.
21. Linares F, Giorgio S, Mortara RA, Santos CX, Yamada AT, et al. (2001) Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radic Biol Med* 30: 1234–1242.
22. Nakano Y, Kasahara T, Mukaida N, Ko YC, Nakano M, et al. (1994) Protection against lethal bacterial infection in mice by monocyte-chemotactic and -activating factor. *Infect Immun* 62: 377–383.
23. Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197–216.
24. Medzhitov R, Janeway CA Jr (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298–300.
25. Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885–891.
26. Reddy RC, Chen GH, Tekchandani PK, Standiford TJ (2001) Sepsis-induced immunosuppression: from bad to worse. *Immunol Res* 24: 273–287.
27. Moreno SE, Alves-Filho JC, Rios-Santos F, Silva JS, Ferreira SH, et al. (2006) Signaling via platelet-activating factor receptors accounts for the impairment of neutrophil migration in polymicrobial sepsis. *J Immunol* 177: 1264–1271.
28. Makristathis A, Stauffer F, Feistauer SM, Georgopoulos A (1993) Bacteria induce release of platelet-activating factor (PAF) from polymorphonuclear neutrophil granulocytes: possible role for PAF in pathogenesis of experimentally induced bacterial pneumonia. *Infect Immun* 61: 1996–2002.
29. Rijnveld AW, Weijer S, Florquin S, Speelman P, Shimizu T, et al. (2004) Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *J Infect Dis* 189: 711–716.
30. Castro Faria Neto HC, Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA (2005) Regulating inflammation through the anti-inflammatory enzyme platelet-activating factor-acetylhydrolase. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1: 83–91.
31. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM (2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69: 419–445.
32. Zisman DA, Kunkel SL, Strieter RM, Tsai WC, Bucknell K, et al. (1997) MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. *J Clin Invest* 99: 2832–2836.
33. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM, et al. (1999) Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B₄. *J Immunol* 163: 6148–6154.
34. Gomes RN, Figueiredo RT, Bozza FA, Pacheco P, Amancio RT, et al. (2006) Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock* 26: 457–463.
35. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109–142.
36. Fierro IM, Nascimento-DaSilva V, Arruda MA, Freitas MS, Piotrowski MC, et al. (1999) Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *J Leukoc Biol* 65: 508–514.
37. Kaplan SS, Lancaster JR Jr, Basford RE, Simmons RL (1996) Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infect Immun* 64: 69–76.
38. Malavista SE, Montgomery RR, van Blaricom G (1992) Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasm. A new microbicidal pathway for polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 90: 631–636.
39. Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, et al. (2002) Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun* 70: 3602–3610.
40. Depaolo RW, Lathan R, Rollins BJ, Karpus WJ (2005) The chemokine CCL2 is required for control of murine gastric *Salmonella enterica* infection. *Infect Immun* 73: 6514–6522.
41. Cunha FQ, Assreuy J, Moss DW, Rees D, Leal IM, et al. (1994) Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF-alpha and IL-1-beta. *Immunology* 81: 211–215.
42. Guo HT, Cai CQ, Schroeder RA, Kuo PC (2002) Nitric oxide is necessary for CC-class chemokine expression in endotoxin-stimulated ANA-1 murine macrophages. *Immunol Lett* 80: 21–26.
43. Biswas SK, Sodhi A, Paul S (2001) Regulation of nitric oxide production by murine peritoneal macrophages treated in vitro with chemokine monocyte chemoattractant protein 1. *Nitric Oxide* 5: 566–579.
44. Okuma T, Terasaki Y, Sakashita N, Kaikita K, Kobayashi H, et al. (2006) MCP-1/CCR2 signalling pathway regulates hyperoxia-induced acute lung injury via nitric oxide production. *Int J Exp Pathol* 87: 475–483.
45. Aliberti JC, Machado FS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Silva JS (1999) Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infect Immun* 67: 2810–2814.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANEXO V

de Andrade et al. *Journal of Inflammation* 2014, **11**:11
<http://www.journal-inflammation.com/content/11/1/11>



RESEARCH

Open Access

The effect of thiamine deficiency on inflammation, oxidative stress and cellular migration in an experimental model of sepsis

José Antenor Araújo de Andrade^{1†}, Carlos Roberto Machado Gayer², Natália Pereira de Almeida Nogueira², Márcia Cristina Paes^{2†}, Vera Lúcia Freire Cunha Bastos^{2†}, Jayme da Cunha Bastos Neto^{2†}, Sílvio Caetano Alves Jr.³, Raphael Molinaro Coelho³, Mariana Gysele Amarante Teixeira da Cunha³, Rachel Novaes Gomes^{3†}, Márcia Barbosa Águila^{4†}, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda^{4†}, Patrícia Torres Bozza^{3†} and Sérgio da Cunha^{1*†}

Abstract

Background: Sepsis is a prevalent condition in critically ill patients and may be associated with thiamine deficiency (TD). The aim of this study was to evaluate the effect of TD on inflammation, oxidative stress and cellular recruitment in a sepsis model.

Methods: The experimental sepsis model, cecal ligation and puncture (CLP), was utilized on mice in comparison with a sham procedure. The following four groups were compared against each other: SHAM with AIN93G complete chow, SHAM with thiamine deficient (TD) chow, CLP with AIN93G complete chow, and CLP with TD chow. Thiamine pyrophosphate (TPP) blood concentrations were determined, and blood and peritoneal fluid were evaluated for differences in TNF- α , IL-1, IL-6, KC and MCP-1/CCL2 levels. In addition, the levels of 4-HNE adducts in liver proteins were evaluated by Western Blot.

Results: The mean TPP blood concentration from the mice fed with the complete chow was 303.3 ± 42.6 nmol/L, and TD occurred within 10 days. TNF- α and MCP-1 concentrations in the peritoneal fluid were significantly greater in the CLP with TD chow group when compared with the other groups. The blood IL-1 β level, however, was lower in the CLP with TD chow group. Liver 4-HNE levels were highest in the TD chow groups. Blood mononuclear cell numbers, as well as peritoneal total leukocyte, mononuclear cell and neutrophil numbers were greater in the CLP with TD chow group. Peritoneal bacterial colony forming units (CFU) were significantly lower in the CLP with TD chow group.

Conclusion: TD was associated with greater bacterial clearance, oxidative stress and inflammatory response changes.

Keywords: Thiamine, Sepsis, Oxidative stress, Inflammation, Sepsis model

Background

Several clinical conditions, such as trauma, burn, severe acute illness and major postoperative surgery generate a series of organic response reactions in response to these injuries, called the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). When SIRS is associated with an infection, it is defined as sepsis [1-3]. Epidemiological studies worldwide [4-6] and in Brazil [7,8] indicate that sepsis is a

prevalent condition with a high mortality rate that is associated with the emergence of multidrug-resistant pathogens [9,10] while also generating high social and financial costs [11]. Thiamine (vitamin B1) is a water soluble vitamin that does not accumulate in the body; therefore, it has to be ingested daily [12]. Thiamine pyrophosphate (TPP; the biologically active form of vitamin B1) is an important mitochondrial enzyme cofactor [12] with a key role in energy balance. In addition, TPP participates as a transketolase cofactor in the pentose phosphate pathway, a pathway that replenishes NADPH, which is necessary for the recovery of the reduced form of glutathione (GSH) from its oxidized form. TPP is also a cofactor of the α -ketoglutarate

* Correspondence: sergio.d.cunha@gmail.com

[†]Equal contributors

¹Intensive Care Unit, Pedro Ernesto University Hospital, State University of Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro 87, Rio de Janeiro, RJ CEP 20551-030, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 de Andrade et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited.



dehydrogenase complex [12], theoretically participating in the recovery of cellular reducing power [13].

The prevalence of TD in critically ill patients has been described [14-16] and was associated with increased morbidity and mortality [16]. Recent studies have demonstrated that additional attention is needed in the identification of thiamine deficiency (TD) and that thiamine supplementation is necessary not only in intensive care unit patients but also in patients with heart failure [15,17,18].

Evidence that TD may cause heart failure has been demonstrated [12,19,20], whereby an increase in oxidative stress due to TD led to the apoptosis of cardiomyocytes [21] and produced cardiac remodeling [20,22]. Structural remodeling and the destruction of cardiomyocyte mitochondria were also observed with TD [20]. A similar finding was observed in a study with human neuroblastoma cells cultured under TD conditions [23].

Several neurological disorders have been associated with TD, including acute confusion and changes in eye movement and gait (Wernicke's encephalopathy). These findings may be associated with chronic memory impairment (Korsakoff's syndrome) [12,24,25]. Thiamine deficiency may also be associated with brain degenerative conditions such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease [24-27]. Thiamine deficiency is also associated with lesions of the endoplasmic reticulum of neurons [28]. The influence of TPP in an experimental model of sepsis in dogs has recently been performed [29], and the following outcomes were analyzed: blood pH, oxygen consumption, base excess, mean arterial pressure and the cardiac index. The authors observed recovery of all of these parameters in the animals treated with TPP, suggesting the involvement of thiamine as a possible protective agent against the onset of sepsis.

Sepsis is associated with an intense inflammatory response [30]. In response to an injury, the initial inflammatory response is the activation of the innate immunity pathways. The innate inflammatory response is a series of "primitive" non-specific reactions that occur in the early hours after the interaction with a pathogen and involve acute phase proteins, the complement system, dendritic cells, macrophages and natural killer cells (NK), with the end result being inflammation [31-34]. When an activated macrophage comes into contact with a pathogen, it begins to produce TNF- α , which is responsible for an increase in vascular permeability. In addition, pathogen stimulation of macrophages leads to the production of IL-1 β and IL-6, which have decisive roles in the genesis of fever by acting on the central hypothalamic temperature control system [34]. The chemotactic factors KC and MCP-1 are involved in the recruitment of neutrophils and monocytes, respectively, and are involved in the perpetuation of the cellular response to injury. In parallel, IL-10 secretion is a self-regulatory mechanism of the

inflammatory response, acting as an anti-inflammatory cytokine [30,31].

The cellular injury observed in sepsis produces highly reactive biochemical intermediates from nitrogen and oxygen [35]. Following an injury, we now know that the increased production of reactive oxygen species (ROS) and the increased activity of clearance mechanisms do not necessarily indicate cell damage [35,36]. ROS have the ability to react with proteins, lipids, and genetic material. The products of these reactions are known today and include 4-hydroxy 2-nonenal (4-HNE), an aldehyde that results from the lipid peroxidation of the cell membrane [37]. 4-HNE plays a key role in cell signaling and redox balance [38,39], but in high concentrations, it can be harmful to cells [37-39].

Experimental sepsis models are necessary to evaluate some aspects of this clinical condition, due to ethical constraints [40-42]. Many methods are used to simulate hemodynamic, immunological and clinical sepsis events, including surgical manipulation of organs (such as ligation or perforation of the bowel loops) [42] and injection of bacteria or their components (e.g., endotoxins, such as gram-negative lipopolysaccharides) into the bloodstream [41], organs and anatomical cavities. These methods are not free of criticisms from both a methodological standpoint [43,44] and from technical and ethical standpoints, with regard to animal handling [45]. These experimental models, however, represent important tools for sepsis investigation.

This study analyzed the possible effect of thiamine deficiency on changes in sepsis markers of inflammation (cytokines), the balance of the oxidation-reduction system (based on the presence of a marker of lipid peroxidation), and the leukocyte recruitment profile. The hypothesis in question was that thiamine deficiency in experimental sepsis conditions could result in a pro-inflammatory profile, with greater oxidative stress and cellular migration.

Methods

This study was approved by the ethics committee for the use of animals for research at the Roberto Alcântara Gomes Biology Institute – UERJ (CEUA/036/2011).

Animals and chow

Sixty-five male C57bl6 mice (Cecal – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), between 6 and 8 weeks old, were maintained in groups of 5 per cage, with free access to water and food. The mice were exposed to a 12-hour light cycle (lights off until 6 a.m. and a controlled temperature (24°C \pm 2°C). Two types of chow were used for the study (Pragsoluções Biotécnicas, Jaú, SP, Brazil). The first type of chow contained all of the components of a normal AIN93G chow [46]. The second chow type was similar to the AIN93G chow but without the addition of thiamine. Before each experiment, all groups were fed



with the AIN93G chow for one week to standardize the thiamine intake. Throughout the study, the animal's body weight and chow intake were measured.

Determining the time required for TD

To determine the time required to produce a TD, mice were divided into five groups (five animals per group). Initially, all groups were fed with the AIN93G chow for seven days to standardize the thiamine intake. The control group was sacrificed after seven days, and blood was collected for determination of the circulating thiamine levels by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The other four groups were fed with the thiamine deficient AIN93G chow for an additional 10, 15, 20 and 25 days before euthanasia, and blood samples were collected for HPLC analyses. We determined the normal concentration of TPP in C57bl6 mice, which is information that was not found in prior studies. Thiamine deficiency was defined as a TPP blood concentration lower than two standard deviations below the mean.

The experimental sepsis procedure

For the experimental sepsis model experiments, forty mice were divided into 4 groups (10 animals per group), and the duration of the each experiment was 15 days. The experimental groups were as follows: 1) a control group fed with the AIN93G complete chow that was subjected to laparotomy without cecal ligation and puncture - CLP (sham); 2) a group fed with the AIN93G complete chow that was subjected to laparotomy and CLP; 3) a group fed with the thiamine deficient AIN93G chow that was subjected to laparotomy without CLP; and 4) a group fed with the thiamine deficient AIN93G chow and subjected to laparotomy and CLP. For all groups, euthanasia was performed 24 hours after surgery to collect liver and blood samples.

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (65 mg/kg) and xylazine (13 mg/kg) (Vetbrands Brazil, Campinas, SP, Brazil). A cutaneous abdominal incision was made longitudinally and medially, approximately 2 centimeters in length, followed by opening of the peritoneum and cecum identification. The cecum was then ligated to form a closed intestinal loop and was perforated two times by an 18 gauge needle. The closed loop was gently compressed to expose the abdominal cavity to feces, and then the intestinal loop was placed back into the abdominal cavity. The peritoneum and skin were then sutured closed. Sham-operated mice were subjected to identical procedures, except the cecum ligation and puncture steps were omitted. After surgery, a sterile saline subcutaneous injection was given for fluid replacement [42,47]. Euthanasia was performed by an injection of double the amount of anesthetic that was calculated for each animal during the CLP or sham surgeries. Following euthanasia, a blood sample was collected and the abdomen was opened for liver removal.

Blood sample preparation for HPLC

The blood samples were preserved by refrigeration and processed on the same day of collection. Whole blood was frozen three times in liquid nitrogen to complete hemolysis and was then centrifuged at 14,000 rcf. Then, after thirty minutes of rest, the liquid phase was collected and deproteinized by the addition of 40% trichloroacetic acid (TCA). The TCA was then extracted with five volumes of water-saturated ethyl ether. To form the thiamine thiochrome derivatives, the lower watery fraction was collected and derivatized by adding 50 μ L of potassium ferricyanide (30.4 mmol/L) and 50 μ L of sodium hydroxide (0.8 mol/L) for each 1,000 μ L aliquot of blood. The final sample was frozen at -70°C for later analysis by HPLC [20].

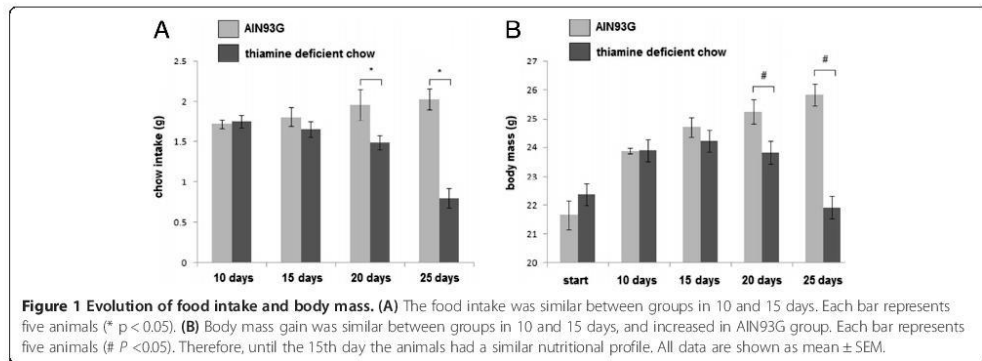
The determination of TPP by HPLC/fluorescence

After derivatization, 100 μ L of the final sample was injected into a Hypersil Gold Amino column (Thermo, USA) (250 \times 4.6 mm, 5 μ m particle). The Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisted of a LC-10 AD pump valve 535, and a fluorimetric RF-detection method was utilized, based on the excitability of the thiochrome to fluorescent light.

The mobile phase (isocratic), with 30% acetonitrile in a potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5), was pumped at a flow rate of 1.0 mL/min. The fluorimetric detection occurred at 450 nm emission and 370 nm excitation wavelengths [20,48]. Standards equivalent to 4.6875, 9.375, 18.75, 37.5, 75, 150, 300 and 600 nmol/L were prepared for the construction of calibration curves.

The assessment of 4-HNE in the liver by western blot

About 100 mg of hepatic tissue were homogenized in 500 μ L of lysis buffer (50 mM HEPES, 1 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 mM EDTA; pH 6.4), containing protease inhibitor cocktail Sigma-Adrich Fine Chemicals (1.04 mM AEBSE, 800 nM aprotinin, 20 μ M leupeptin, 40 μ M bestatin, 15 μ M pepstatin A and 14 μ M E-64) in ice. Tissue homogenate was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. the pellet was discarded and the supernatants were used for protein quantification by the Peterson's method. Whole protein extracts (about 80 μ g) were subjected to electrophoresis in a 15% SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. Proteins were transferred (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3, 20% methanol) to a nitrocellulose membrane at 4°C for 2 h. Membranes were blocked with Tris-buffered saline solution containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) and 5% bovine serum albumin (BSA). The membranes were then incubated overnight with anti-4-HNE antibody (1:1000), diluted in blocking solution, washed in TBS-T, and finally incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1:10,000). The bands were revealed by chemiluminescence using the ECL substrate. Blots were exposed to ECL



Hyperfilm (Amersham) and quantification was performed by densitometric analysis of the exposed films (Adobe Photoshop 5 programme) and the Ponceau S stained membranes were used as a load control [49].

Blood and peritoneal fluid cell counts

Blood and peritoneal fluid samples were stained with Giemsa stain for total and differential leukocyte counts by optical microscopy at 1,000x magnification in a Neubauer chamber [47].

Blood and peritoneal fluid cytokine determination

Determination of the blood and peritoneal fluid TNF- α , IL-1, MCP-1/CCL2, IL-6 and KC levels were performed by ELISA (Duo Set Kit - R & D systems, USA). ELISA plate reading was performed on an ELISA plate reader at 450 nm. The data were analyzed using the Soft Max Pro program, and cytokine concentrations were determined based on their respective standard curves [47].

Peritoneal fluid colony-forming unit counts

The peritoneal fluid sample colony-forming unit (CFU) counts were obtained by diluting the peritoneal fluid samples 1:50 in sterile PBS, and then the diluted samples were seeded in Petri dishes with TSA growth medium. The plates were incubated at 37°C for 24 hours, after

which the number of CFUs was counted. The whole procedure was performed under sterile conditions [47].

Statistics analyses

A two-way ANOVA with a Sidak post-test was used to analyze the differences between the groups for the biochemical, immunological and cellular assays, to perform a multiple comparison analysis between the variables and to evaluate the contribution of each variable. The software used was the Windows version of Prism 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The significance level was set at 0.05 [50].

Results

The body weight evolution and chow intake

The AIN93G chow intake by the mice increased during the experiments; however, the average TD chow intake was reduced significantly by the 20th and 25th days (Figure 1A). The body mass gain of the animals fed with the AIN93G complete chow increased during the first experiment. Body weight loss occurred at the 20th and 25th days in the animals fed with the TD chow (Figure 1B).

Determining the efficiency and time required for TD

Initially, the time required for TD was determined. Using HPLC, the mean retention times were 3.4 minutes

Table 1 Thiamine pyrophosphate whole blood mean concentration

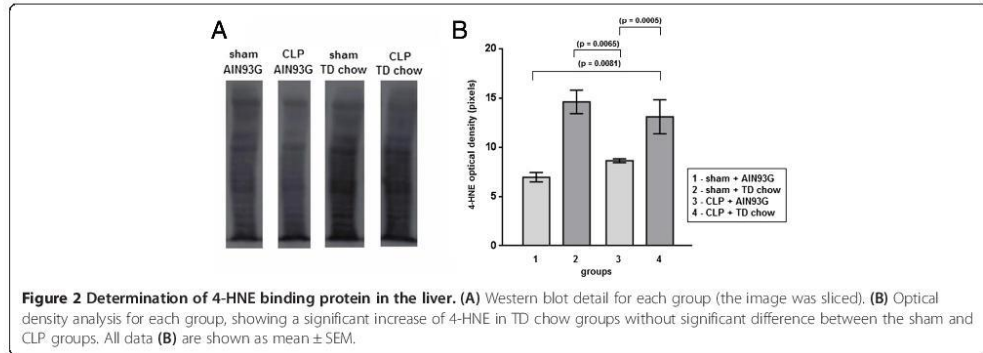
	TPP nmol/L (mean \pm SEM)	p (compared to control)
Control (AIN93G)	303.3 \pm 19.06	-
10 days of TD chow	11.93 \pm 1.11	< 0.001
15 days of TD chow	5.01 \pm 0.67	< 0.001

After 10 days of TD chow, the thiamine pyrophosphate whole blood mean concentration was lower than two standard deviations below the mean, what characterizes thiamine deficiency in these animals.

Table 2 Thiamine pyrophosphate whole blood mean concentration for all groups in sepsis experiment

Group	TPP nmol/L (mean \pm SEM)	p
(1) sham + AIN93G	383.6 \pm 15.39	-
(2) sham + TD chow	41.4 \pm 10.73	< 0.001 (compared to group 1)
(3) CPL + AIN93G	376.9 \pm 12.17	-
(4) CLP + TD chow	40 \pm 6.87	< 0.001 (compared to group 3)

The groups that were fed with TD chow for 15 days showed significantly lower blood TPP concentrations than groups that were fed with complete chow, profile that was similar to that found in the first experiment.



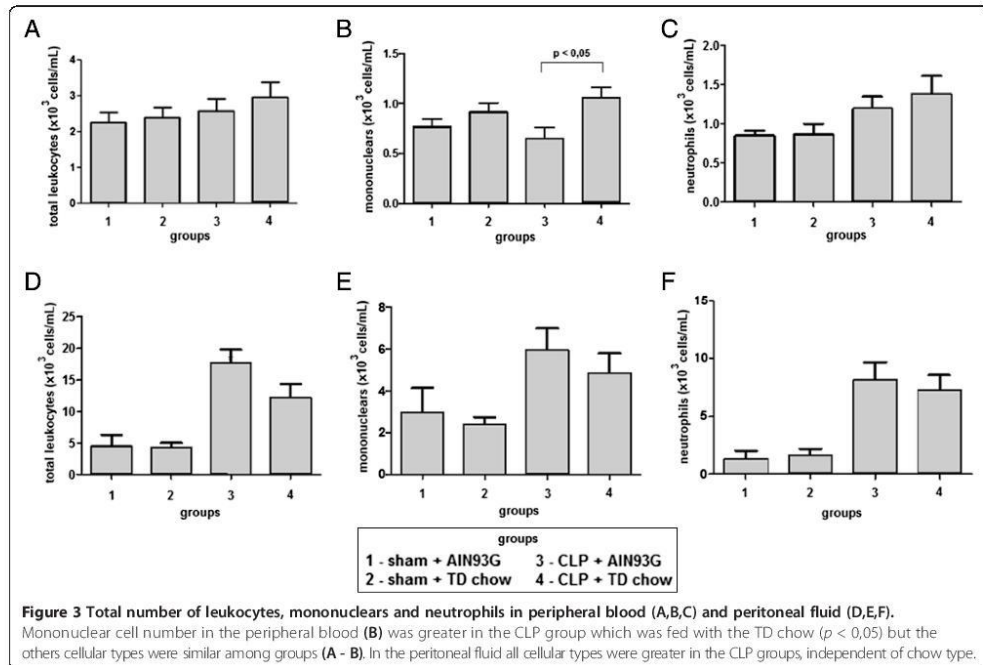
for free thiamine, 5.3 minutes for thiamine monophosphate, and 6.2 minutes for the TPP. The TPP detection limit was 4.6875 nmol/L. The mean blood TPP concentration in the mice fed the AIN93G complete chow was 303.3 ± 42.6 nmol/L. Thiamine deficiency was observed at 10 days in the mice fed the TD chow, and the blood concentration of TPP in this group at this time point was 12.5 ± 2.4 nmol/L (Table 1).

The TPP blood concentrations were also assessed in the sepsis experiments for validation purposes. As shown in

Table 2, both the sham and CLP groups that were fed with TD chow for 15 days showed significantly lower blood TPP concentrations than the sham and CLP groups that were fed with complete chow (Table 2).

Effect of TD on 4-HNE-protein adduct formation

As shown in Figure 2, we observed an increased level of 4-HNE adducts in liver proteins of TD animals when compared with the animals fed with the AIN93G complete





chow. There was no significant difference between the sham and CLP groups (Figure 2).

Blood and peritoneal fluid cell counts

The total number of leukocytes and neutrophils in the peripheral blood was similar in all groups. However, the mononuclear cell number in the peripheral blood was greater in the CLP group that was fed with the TD chow (Figure 3 ABC). In the peritoneal fluid, total leukocyte, mononuclear cell and neutrophil counts were greater in the CLP groups, independent of whether the mice were fed the AIN93G complete or the TD chow (Figure 3 DEF).

Effect of TD on the blood and peritoneal fluid cytokine levels during sepsis

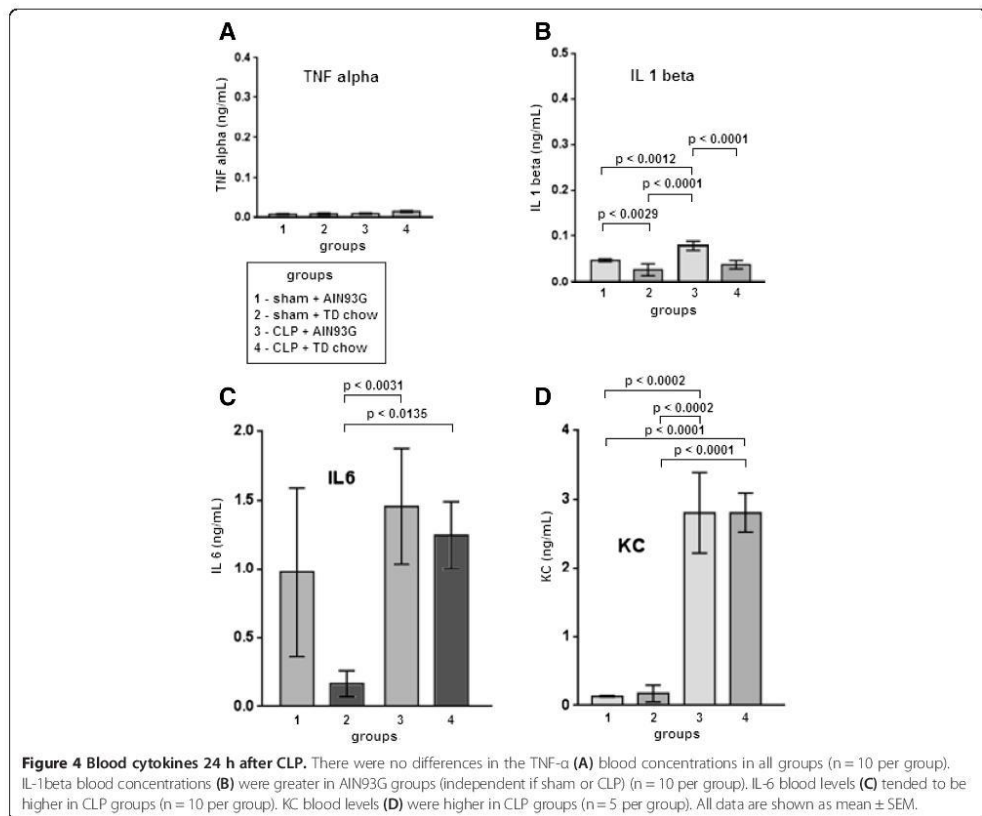
As shown in Figure 4, 24 h after CLP, the levels of TNF- α , KC, IL-1 β and IL-6 were significantly increased when compared with the sham groups. There were no differences in the TNF- α , KC and IL-6 blood concentrations when the

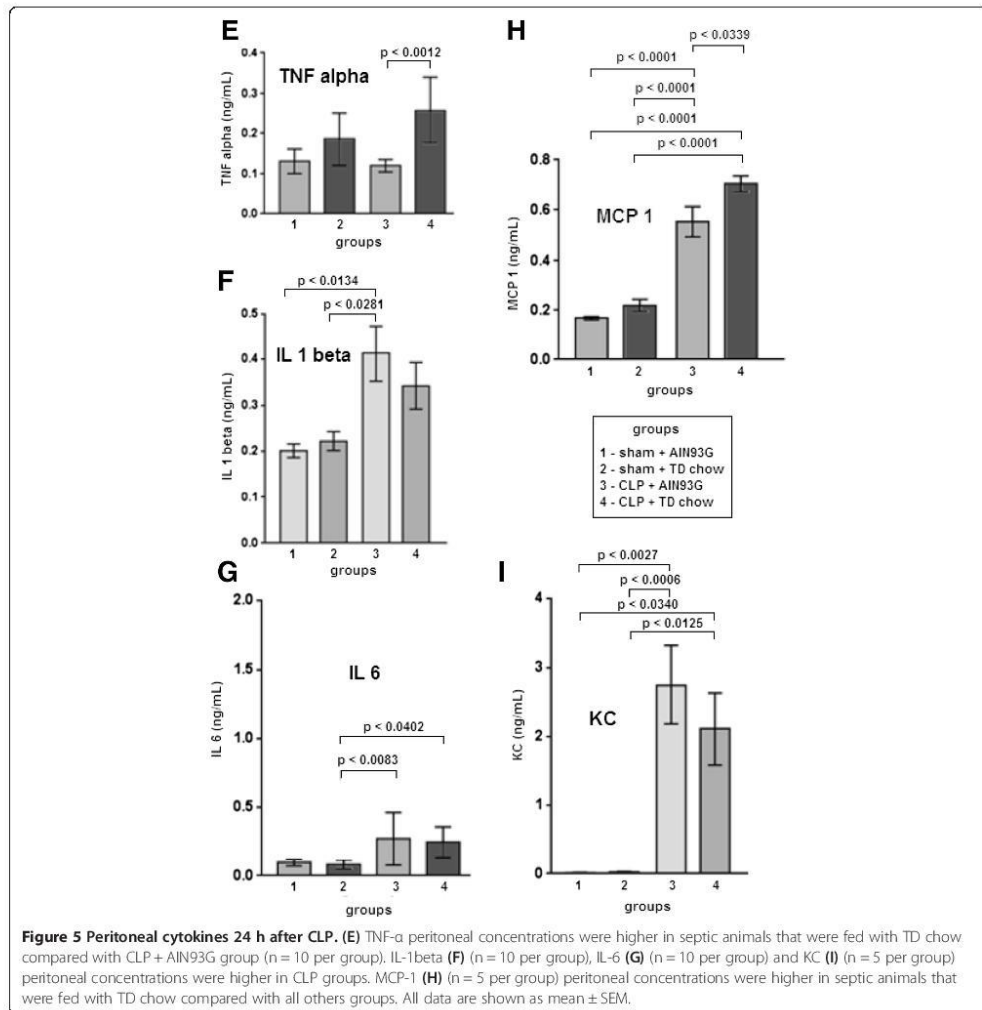
CLP with TD chow group was compared with the CLP with AIN93G complete chow group (Figure 4). Interestingly, the IL-1 β blood concentration was greater in the groups that were fed the AIN93G complete chow (independent of sham or CLP surgeries) when compared with the TD chow groups ($p < 0.0001$) (Figure 4).

In Figure 5, the local peritoneal production of the cytokines was evaluated. The peritoneal concentrations of KC, IL-1 β and IL-6 were greater in the CLP groups, independent of whether the mice were fed the complete or TD chow (Figure 5). Interestingly, the MCP-1 and TNF- α peritoneal fluid concentrations were significantly greater in the CLP groups than in the other groups. Both CLP and TD contributed to the elevation of MCP-1 and TNF- α in the peritoneal fluid (Figure 5).

Peritoneal fluid colony forming unit counts

The CLP group with AIN93G complete chow displayed a higher bacterial clearance capacity when compared with all





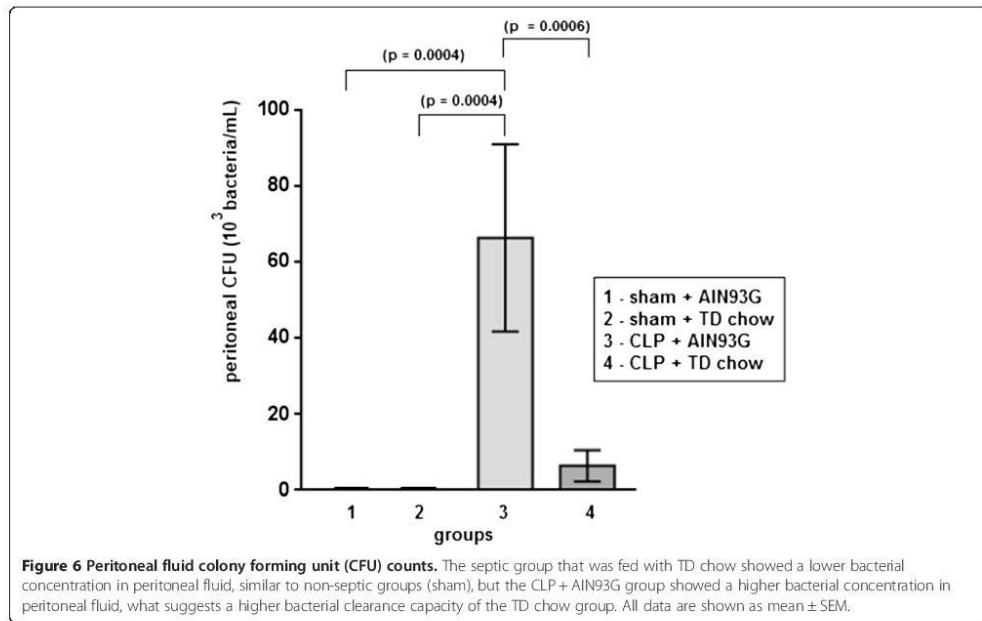
of the other groups, including the CLP group fed the TD chow, where the bacterial clearance was equivalent to the sham animal groups (Figure 6).

Discussion

In this study, we found that mice fed the thiamine deficient AIN93G chow had significantly reduced levels of the biologically active form of thiamine in their serum, providing an experimental condition to assess the effect of thiamine deficiency during sepsis.

First, the normal blood TPP concentration and the number of days necessary for TD induction with TD chow in the mice were determined. Of note, this information had not yet been described in previous research.

The chow intake and mass gain were progressive in the AIN93G complete chow fed animals. In contrast, a decrease in the chow intake and a loss of body weight throughout the study were observed in the mice fed the thiamine deficient chow. This was a profile similar to what was previously described with Wistar rats [20].



Although the animals fed with the thiamine deficient chow for 10 days displayed a significant reduction of TPP in the blood, the decision to carry out the sepsis experiments after 15 days was made to leave no doubt that thiamine deficiency induction had occurred. Because there was no significant difference in the body mass gain and chow intake between the groups on the 15th day, it was not necessary to perform a paired feeding to avoid errors related to ingestion of different amounts of calories, proteins and other nutrients among the groups.

The levels of IL-6, MCP-1 and KC in the blood and of IL-1 β , IL-6 and KC in the peritoneum were not different among the septic groups, independent of their thiamine status. In addition, CLP increased the number of bacteria in the peritoneum, except in the TD group, where the bacterial recovery was similar to that observed in the sham groups.

The level of TNF- α in the peritoneal fluid of the septic animals fed with TD chow was significantly greater than that observed in the other groups. TNF- α is a cytokine of the early innate inflammatory response. It is produced within the first hour of injury, with a peak between the second and third hours following injury. For this reason, it is not usually used in the monitoring of septic patients [51] because the timing of the peak TNF- α level may have already passed when these patients are first evaluated. However, TNF- α is an early marker of inflammation

commonly used in sepsis models [47]. TNF- α is a marker of the activity of NK cells and macrophages and may help explain the increased bacterial clearance in the peritoneal fluid that was observed in the CLP mice fed the TD chow used in this study. In addition, we observed a persistent high level of TNF- α in the peritoneal fluid of the CLP mice fed the TD chow, although the number of total leukocytes, monocytes and neutrophils in the peritoneal fluid was similar between the septic animals, independent of their thiamine status. This finding suggests that TD may not change cellular recruitment into the peritoneal cavity following sepsis and that another mechanism may be involved in the increased peritoneal bacterial killing observed in the CLP group fed with TD chow, possibly mediated by TNF- α .

Lipid peroxidation is one of the hallmarks of the oxidative stress. Lipid peroxides are usually decomposed into reactive aldehydes such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), which are also reactive oxygen species. Due to its electrophilic properties, the aldehyde 4-HNE forms adducts with cellular proteins [52]. The present study also demonstrated a greater level of liver proteins modified by 4-HNE in the animals subjected to TD chow compared with what was observed in the other groups. This finding was expected, considering that thiamine may be associated with a lower efficiency of cellular reducing power, since enzymes



such as pyruvate dehydrogenase and α -KGDH are responsible for increasing NADH levels in the cell, favoring oxidative stress. Thus, one could suppose that thiamine deficiency also creates greater oxidative stress in the peritoneal cavity, therefore potentially inhibiting bacterial proliferation. The increased bacterial clearance that was observed in this study might initially suggest a better outcome against sepsis in these animals; however, the increased TNF- α levels, may also be detrimental to sepsis outcomes. Indeed, it was reported that following CLP, an increased mortality rate occurred in animals that displayed an unbalanced inflammatory response, despite a greater bacterial clearance [53].

Extending the analysis of inflammation beyond the first 24 hours after the initiation of sepsis may present a more complete picture of the dynamics of the interleukins.

It is important to remember that the model of sepsis used in the present study can be adjusted to induce a low mortality rate, which may also allow for the investigation of thiamine deficiency in the mechanisms of immunologic tolerance.

Conclusions

TD was associated with a greater bacterial clearance in the peritoneal fluid, greater oxidative stress and a change in the immune response profile in an experimental model of abdominal sepsis in mice. Further investigation is needed to define the impact of these changes on the severity of sepsis, septic mortality, and also to elucidate the participation of other cellular and biochemical mechanisms.

Abbreviations

4-HNE: 4-hydroxy 2-nonenal; AIN93G: Kind of animal feed suggested by the American Institute of Nutrition in 1993; CFU: Colony-forming unit; CLP: Cecal ligation and puncture; GSH: Glutathione; HPLC: High performance liquid chromatography; IL-10: Interleukin-10; IL-1 β : Interleukin 1 beta; IL-6: Interleukin 6; iNOS: Inducible form of nitric oxide synthase; KC: Keratinocyte chemoattractant; MCP-1/CCL2: Monocyte chemoattractant protein-1; NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NK: Natural killer cells; nmol/L: Nanomole per liter; ROS: Reactive oxygen species; SIRS: Systemic inflammatory response syndrome; TCA: Trichloroacetic acid; TD: Thiamine deficiency; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; TPP: Thiamine pyrophosphate; α -KGDH: Alpha-ketoglutarate dehydrogenase.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: JAAA, VLFCB, JCBN, PTB and SC. Performed the experiments: JAAA, CRMG, NPAN, SCAJ, MGATC, RMC, and RNG. Analyzed the data: JAAA, MCP, VLFCB, JCBN, MBAML, CRMG, NPAN, SCAJ, MGATC, RM, RNG, PTB and SC. Contributed reagents/materials/analysis tools: MCP, VLFCB, JCBN, RNG, PTB and CAML. Wrote the paper: JAAA, CAML, PTB, and SC. All the authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The study was supported by PROAP/CAPES. We thank Lin Machado de Lima, Roosevelt Aguiar Dias and Paulo Roberto Marques for their skillful assistance.

Author details

¹Intensive Care Unit, Pedro Ernesto University Hospital, State University of Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro 87, Rio de Janeiro, RJ CEP 20551-030, Brazil. ²Biochemistry Department, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ³Immunopharmacology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Morphometry, Metabolism & Cardiovascular Laboratory, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 21 July 2013 Accepted: 14 April 2014

Published: 24 April 2014

References

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine: Consensus conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992, **20**:864-874.
2. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001, **345**:1368-1377.
3. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL: Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2008, **36**(1):296-327.
4. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grund S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Opper M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Struber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K: Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007, **33**(4):606-618.
5. Zahorec R, Firment J, Straková J, Mikula J, Malik P, Novák I, Zeman J, Chlebo P: Epidemiology of severe sepsis in intensive care units in the Slovak Republic. *Infection* 2005, **33**(3):122-128.
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001, **29**:1303-1310.
7. Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú AM, Cleovaldo TS, Pinheiro CTS, Friedman G, Silva OB, Dias MDA, Koterba E, Dias FS, Piras C, Luiz RR: Sepsis Brasil: epidemiological study of sepsis in intensive care units brazilian. *Braz J Intensive Care* 2006, **18**(1):9-17.
8. Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E: Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 2004, **8**(4):251-260.
9. Soriano FG: Sepsis: Cellular, Tissue and Organ Alterations In: Experimental Model Of Sepsis. Role of Cytokines and Gene Expression. In *PhD Thesis*. São Paulo University: Medicine School; 2006.
10. Antonelli M, Bonten M, Chastre J, Citerio G, Conti G, Curtis JR, De Backer D, Hedenstierna G, Joannidis M, Macrae D, Mancebo J, Maggiore SM, Mebazaa A, Preiser JC, Rocco P, Timsit JF, Weirnerman J, Zhang H: Cardiovascular, infections, pneumonia and sepsis, critical care organization and outcome, education, ultrasonography, metabolism and coagulation. *Intensive Care Med* 2012, **38**(3):345-358.
11. Sogayar AMC, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CMC, Lobo SMA: Prospective study to evaluate costs of septic patients in brazilian intensive care units. *Pharmacoecon* 2008, **26**(5):425-434.
12. Butterworth RF: Thiamine. In *Modern Nutrition in Health and Disease*. 10th edition. Edited by Shils ME, Lippincott: Williams & Wilkins; 2006:426-433.
13. McClain AL, Szweda PA, Szweda LI: α -Ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor. *Free Radic Res* 2011, **45**(1):29-36.
14. Domino MW, Carney E, Cocchi MN, Barbash I, Chase M, Joyce N, Chou PP, Ngo L: Thiamine deficiency in critically ill patients with sepsis. *J Crit Care* 2010, **25**:576-581.
15. Manzaneres W, Hardy G: Thiamine supplementation in the critically ill. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011, **14**(6):610-617.
16. Lima LFP, Leite HP, Taddei JAA: Low blood thiamine concentrations in children upon admission to the intensive care unit: risk factors and prognostic significance. *Am J Clin Nutr* 2011, **93**(1):57-61.



17. Schoenenberger AW, Schoenenberger-Berzins R, Maur C, Suter M, Vergopoulos A, Erne M: **Thiamine supplementation in symptomatic chronic heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over pilot study.** *Clin Res Cardiol* 2012, **101**:159–164.
18. Sriram K, Manzanares W, Joseph K: **Thiamine in nutrition therapy.** *Nutr Clin Pract* 2012, **27**(1):41–50.
19. Azizi-Namini P, Ahmed M, Yan AT, Keith M: **The role of B vitamins in the management of heart failure.** *Nutr Clin Pract* 2012, **27**(3):363–374.
20. Cunha S, Cunha JB, Salles JB, Silva MC, Cunha Bastos VL, Mandarim-De-Lacerda CA: **Cardiac alterations in furosemide-treated thiamine-deprived rats.** *J Card Fail* 2007, **13**(9):774–784.
21. Gioda CR, Barreto TO, Primola-Gomes TN, De Lima DC, Campos PP, Capettini LS, Lauton-Santos S, Vasconcelos AC, Coimbra CC, Lemos VS, Pesquero JL, Cruz JS: **Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010, **298**:2039–2045.
22. Wang Y, Cheng J, Chen G, Rob F, Naseem RH, Ngyen L, Johnstone JL, Hill JA: **Remodeling of outward K⁺ currents in pressure-overload heart failure.** *J Cardiovasc Electrophysiol* 2007, **18**(2):869–875.
23. Wang J, Hua Z, Fentress HM, Singleton CK: **JNK1 is inactivated during thiamine deficiency-induced apoptosis in human neuroblastoma cells.** *J Nutr Biochem* 2000, **11**:208–215.
24. Hazell AS: **Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy.** *Neurochem Int* 2009, **55**(1):129–135.
25. Hazell AS, Butterworth RF: **Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation.** *Alcohol Alcohol* 2007, **44**(2):141–147.
26. Hirsch JA, Parratt J: **New considerations on the neuromodulatory role of thiamine.** *Pharmacology* 2012, **89**(1–2):111–116.
27. Karuppagounder SS, Xu H, Shi Q, Chen LH, Pedrini S, Pechman D, Baker H, Beal MF, Gandy SE, Gibson GE: **Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model.** *Neurobiol Aging* 2009, **30**(10):1587–1600.
28. Wang X, Wang B, Fan Z, Shi X, Ke ZJ, Luo J: **Thiamine deficiency induces endoplasmic reticulum stress in neurons.** *Neuroscience* 2007, **144**:1045–1056.
29. Lindenbaum GA, Larrieu AJ, Carroll SF, Kapusnick RA: **Effect of cocarboxylase in dogs subjected to experimental septic shock.** *Crit Care Med* 1989, **17**(10):1036–1040.
30. Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT: **Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis.** *Crit Care* 2007, **11**(2):49.
31. Delves RPJ, Roitt D: **The immune system - first of two parts.** *N Engl J Med* 2000, **343**:37–50.
32. Janeway CA, Medzhitov R: **Innate immunity recognition.** *Annu Rev Immunol* 2002, **20**:197–216.
33. Cerwenka A, Lanier LL: **Natural killer cells, viruses and cancer.** *Nat Rev Immunol* 2001, **1**:41–49.
34. Mosser DM, Edwards JP: **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:958–969.
35. Andriantsitohaina R, Duluc L, Garcia-Rodríguez JC, Gil-Del Valle L, Guevara-García M, Simard G, Soletti R, Su DF, Velásquez-Pérez L, Wilson JX, Laher I: **Systems biology of antioxidants.** *Clin Sci* 2012, **123**(3):173–192.
36. Andrades ME, Arian Morina A, Spasić S, Spasojević I: **Bench-to bedside review: sepsis - from the redox point of view.** *Crit Care* 2011, **15**(5):230.
37. Raza H, John A: **4-Hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2006, **216**(2):309–318.
38. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, Morizane S, Ito H, Hishiki T, Endo J, Zhou H, Yuasa S, Kaneda R, Suematsu M, Fukuda K: **4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway.** *J Mol Cell Cardiol* 2010, **49**:576–586.
39. Sano M: **Cardioprotection by hormetic responses to aldehyde.** *Circ J* 2010, **74**:1787–1793.
40. Wicherman KA, Baue AE, Chaudry IH: **Sepsis and septic shock - a review of laboratory models and a proposal.** *J Surg Res* 1980, **29**:189–201.
41. Remick DG, Peter AW: **Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis.** *Shock* 2005, **24**(1):7–11.
42. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Loring W, Rue I, Chaudry IH: **Cecal ligation and puncture.** *Shock* 2005, **24**(1):52–57.
43. Esmon CT: **Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis?** *Crit Care Med* 2004, **32**:219–222.
44. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward A: **The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis.** *J Leukoc Biol* 2007, **81**:137–143.
45. Machado CJS, Filipecki ATP, Teixeira MO: **Current Brazilian law on animal experimentation.** *Science* 2009, **324**(5935):1643–1644.
46. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey JRCG: **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the ain-76a rodent diet.** *J Nutr* 1993, **123**:1939–1951.
47. Gomes RN: **Therapeutical Potential Of The Paf Acetilhidrolase (Paf-Ah) In The Control Of Sepsis.** In Thesis. Rio de Janeiro: Oswaldo Cruz Institute; 2006.
48. Lu J, Frank EL: **Rapid HPLC measurement of thiamine and its phosphate esters in whole blood.** *Clin Chem* 2008, **54**(5):901–906.
49. Kurisaki E, Hiraiwa K: **Western blot analysis for 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-modified proteins in paraquat-treated mice.** *Legal Med* 2009, **11**:431–433.
50. Zar J: *Biostatistical analysis*. 4th edition. Prentice Hall: Upper Saddle River; 1999.
51. Bozza FA, Bozza PT, Faria-Neto HC: **Beyond sepsis pathophysiology with cytokines: what is their value as biomarkers for disease severity?** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005, **100**:217–221.
52. Catalá A: **Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions.** *Chem Phys Lipids* 2009, **157**:1–11.
53. Gomes RN, Teixeira-Cunha MG, Figueiredo RT, Almeida PE, Alves SC, Bozza PT, Bozza FA, Bozza MT, Zimmerman GA, Castro-Faria-Neto HC: **Bacterial clearance in septic mice is modulated by MCP-1/CCL2 and nitric oxide.** *Shock* 2013, **39**(1):63–69.

doi:10.1186/1476-9255-11-11

Cite this article as: de Andrade *et al.*: The effect of thiamine deficiency on inflammation, oxidative stress and cellular migration in an experimental model of sepsis. *Journal of Inflammation* 2014 **11**:11.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANEXO VI

(ARTIGO EM PREPARAÇÃO)

THE CCR2 IS IMPORTANT TO CONSOLIDATION OF SHORT TIME MEMORY AND LONG TIME MEMORY

Teixeira-da-Cunha, M.G.; Alves-Júnior, S.C; Chaves, D.; Albuquerque, D.; Magno, F.; Veronez, T.; Rajao, M.; Guercio, G.; D'Avila, J.C.P.; Piazinuti, R.; Mendez-Otero, R.; Pamplona, F.; Reis, P.A.; Bozza, P. T. ; Bozza, F.A.; Castro-Faria-Neto, H.C. & Gomes, R.N.

ABSTRACT

The CCR2 is a chemokine receptor and your major ligand is the CCL2, in which is severely associated with neuroinflammatory response in infection process, brain trauma, Alzheimer, multiple sclerosis. The CCR2 and CCL2 are expressed and released by immune cells and constitutively expressed in important places of the central nervous system, such as in hippocampus. Studies show that the CCL2/MCP-1 treatment increased the calcium levels inside of the neurons from the hippocampus and cortex. The CCL2 can induce the excitation of neurons from the hippocampus. No study has shown, so far, the role of CCR2 in memory consolidation in physiological conditions. To elucidate this problem, we investigated the role of CCR2 in learning and memory consolidation. CCR2 deficient mice were subjected to water maze test to evaluate contextual memory; subjected to passive avoidance test to analyze the aversive memory; subjected to open field and PPI to examined both motor response and reflex response, and we analyze the swimming velocity in water maze test. In summary the absence of CCR2 was correlated with the impaired in the memory consolidation of contextual memory and of aversive memory in comparison with wild type animals; in delayed learning process, the CCR2^{-/-} require more trials to learn in passive avoidance test. The cognitive dysfunction is not associated to motor and reflex impaired response and the swimming velocity was similar between CCR2^{-/-} mice and wild type mice. Decreased the expression of ERK phosphorylated 1 hour after training in passive avoidance test and decreased expression of mature BDNF in hippocampus 12 hours after training in passive avoidance test. In CCR2 deficient mice we observed decreased co-localization of PSD 95 and Synaptophysin, explained by lower expression of synaptophysin in hippocampus in comparison with WT. These data suggest that the CCR2 is important to fisiological function of synapsis in hippocampus, to neuronal function involved with learning process and to sustentation of the memory.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular