



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



JULIANA FRAGA VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM O FATOR ESTIMULADOR
DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS (G-CSF) NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA EXPERIMENTAL**

Salvador, BA

2012

JULIANA FRAGA VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM O FATOR
ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS (G-CSF) NA
CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Salvador, BA

2012

AGRADECIMENTOS

À Dra Milena Botelho Pereira Soares, chefe do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, por todo apoio e compreensão, pelo convívio e pela confiança em mim depositada. Agradeço também pelo tempo investido, as horas de discussão e pela orientação concedida.

À Dra Simone Garcia Macambira, pela amizade, pelas discussões científicas, pelo carinho e pelo grande incentivo durante toda a minha formação.

Ao Dr Ricardo Ribeiro-dos-Santos, chefe do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, pelo incentivo durante cada etapa do trabalho.

Agradeço ao apoio dos companheiros do LETI e do CBTC, amigos de tantas agruras, por toda amizade, e pela colaboração durante cada etapa do trabalho. Em especial a Alice Kiperstock, Daniele Brustolim, Fabrício Souza, Flávia Maciel, Fernando Costa, Matheus Sá, Ricardo Lima, Sheilla Andrade e Siane Campos.

Ao amigo Bruno Solano pela indescritível ajuda na finalização dos últimos experimentos.

À Adriano Alcântara, Geraldo Pedral, Carine Machado, Carla Kaneto e Cássio Meira pela ajuda técnica e científica durante o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço em particular as alunas de iniciação científica que me acompanharam ao longo dos experimentos e me deram um grande apoio, Fabiana Mascarenhas, Letícia Garcia e Thaise Lins.

Agradeço também às amigas que, mesmo indiretamente, participaram desse trabalho, Sheila Resende e Camila Vasconcelos, pois me suportaram nos piores momentos.

À coordenação da pós-graduação em Biotecnologia pelo apoio e pela preocupação na formação de recursos humanos.

Ao secretário da PPG Biotec, Helton Ricardo, pela atenção, disponibilidade, dedicação, organização e pela enorme paciência e gentileza para com os alunos.

À Lucyvera Imbroinise em especial, pelo trabalho de secretaria do LETI e pelo ombro amigo sempre encontrado por mim.

Aos colegas da Pós- graduação em Biotecnologia.

Agradeço a Universidade Estadual de Feira de Santana pela excelência de seus professores.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz e ao Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael, pela disponibilidade de excelente estrutura física e material.

À FAPESB e CAPES pela concessão das bolsas, imprescindíveis para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, que me presenteia a cada dia com força, paciência e perseverança.

Aos meus pais por proporcionarem minha formação intelectual e moral.

À minha avó Maria Janete Fortunato Fraga, um exemplo de vida.

Às minhas filhas, Giulia e Rafaela, pela compreensão e amor incondicional, pelo apoio e pela eterna cobrança de quando essa tese ia acabar...

À Claudio Roberto Costa por sempre estar ao meu lado, nos momentos alegres ou tristes, e por me acalmar nos momentos de surtos apocalípticos.

Nesse momento me alegro em dizer que esta conquista é nossa!

"N3o existe um caminho para a felicidade. A felicidade 3 o caminho."

Mahatma Gandhi

RESUMO

A cardiopatia chagásica crônica (CChC) acomete cerca de 30% dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, e resulta da destruição progressiva do miocárdio, cujos pacientes evoluem para insuficiência cardíaca e óbito. A escassez de alternativas terapêuticas e a importância socioeconômica da CChC ressaltam a necessidade da busca de novos tratamentos para esta doença. O Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF) é um citocina já utilizada na clínica que tem sido estudada quanto ao seu potencial terapêutico em modelos experimentais de outras doenças cardíacas. Neste trabalho avaliamos os efeitos do tratamento com G-CSF em um modelo experimental de CChC. Camundongos C57BL/6 chagásicos crônicos, seis meses pós- infecção, foram tratados com G-CSF por 3 ciclos (200 µg/kg/dia por 5 dias), com intervalos de uma semana entre cada ciclo, após aprovação pelo comitê de Ética local. Os animais infectados apresentaram alterações cardíacas graves, que foram parcialmente revertidas pelo uso do G-CSF, além de melhora da função cardiorrespiratória avaliada por ergoespirometria. Observamos a redução do infiltrado inflamatório com redução da produção de CXCL12, ICAM-1 e syndecan-4 e do aumento da apoptose de leucócitos no coração dos animais tratados com G-CSF. Demonstramos que tanto a presença de macrófagos quanto a produção de galectina-3 foi reduzida no grupo G-CSF, o que esteve associado com a diminuição da fibrose. O tratamento com G-CSF modulou a produção de IFN- γ e TNF α , com redução da expressão gênica de Tbet, além de proporcionar pequena redução de IL-17, sem modificar significativamente a produção de IL-4 ou GATA-3. O tratamento com G-CSF induziu o aumento da migração de células Treg da medula óssea para a periferia, fato demonstrado pelo aumento dessa população celular no baço e no coração dos animais tratados. A presença de células Foxp3⁺ produtoras de IL-10, assim como a produção elevada de IL-10 no coração e no baço dos animais tratados, parece contribuir para a modulação da resposta inflamatória. Apesar da redução da resposta inflamatória, também observamos a redução da carga parasitária no coração dos animais tratados com G-CSF. A atividade do G-CSF sobre o parasito foi confirmada em ensaios in vitro, onde foi encontrada a redução da viabilidade de tripomastigotas e a redução do número de macrófagos infectados e de amastigotas/macrófago. Em conclusão, o G-CSF exerce efeitos múltiplos em camundongos infectados por *T. cruzi*, atuando como agente modulador da resposta imune e promovendo a redução da carga parasitária, possibilitando a melhora da função cardíaca no modelo de cardiopatia chagásica crônica, o que encoraja o estudo da avaliação do seu potencial terapêutico em pacientes chagásicos.

Palavras-Chave: Cardiopatia chagásica crônica. G-CSF. Imunomodulação. Células T regulatórias. *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Chronic Chagasic cardiomyopathy (CChC) affects approximately 30% of individuals infected with *Trypanosoma cruzi*, and results from a progressive destruction of the myocardium, causing the development of heart failure and death of the patients. The lack of therapeutic alternatives and the socio-economic impact of the CChC emphasize the importance of developing new treatments for this disease. The G-CSF, a cytokine already used in clinical practice, has been studied for its therapeutic potential in other experimental models of cardiac diseases. In this study we evaluated the therapeutic effects of G-CSF in a model CChC. After approval by the local ethics committee, C57BL/6 mice infected with *T. cruzi* for six months were treated with G-CSF in 3 courses (200 µg / kg / day for 5 days) with an interval between the cycles of one week. Infected animals had severe conduction disturbances, partially reversed by the use of G-CSF. In addition, an improvement of the cardiorespiratory function was observed, as assessed by spirometry. We observed a reduction of the inflammatory infiltrate associated with reduced production of SDF-1, ICAM-1 and syndecan-4 and increasing apoptosis of leukocytes in the hearts of the animals treated with G-CSF. We also found that both macrophages, as well as the production of galectin-3, were reduced in the group G-CSF, which is associated with the decrease of fibrosis in the group. Treatment with G-CSF modulates the production of IFN- γ and TNF α , reduced the gene expression of Tbet, while providing a slight reduction in IL-17 without any significant changes in IL-4 or GATA-3. Treatment with G-CSF induced the migration of Treg cells from the bone marrow to the periphery, as demonstrated by increasing this population in spleen and heart of the treated animals. The presence of IL-10-producing Foxp3⁺ cells, as well as an increased production of IL-10 on heart and spleen, suggests that this cytokine contributes to the modulation of the inflammatory response. Despite the reduction of the inflammatory response, we also observed a reduction in parasitic load in the hearts of the animals treated with G-CSF. The activity of G-CSF on the parasite was confirmed in experiments in vitro, in which we found a reduction in the viability of trypomastigotes and in the number of infected macrophages and amastigotes/macrophage. In conclusion, G-CSF exerts multiple effects in mice infected with *T. cruzi*, acting as a modulatory agent in the immune response and promoting the reduction of parasite load, allowing the improvement of cardiac function in chronic Chagas disease model, results which encourage the study of its therapeutic potential in patients with Chagas disease.

Keywords: ChronicChagasic Cardiomiopathy. G-CSF.Immunomodulation. Treg cells. *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática das formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro invertebrado e vertebrado.	13
Figura 2	Imagens representativas de alterações patológicas encontradas em pacientes chagásicos crônicos.	15
Figura 3	A resposta imune nas formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas	17
Figura 4	Modelo computacional proposto para a estrutura tridimensional da molécula do G-CSF humano.	25
Figura 5	Influência das citocinas durante o desenvolvimento das células sanguíneas na medula óssea.	26
Figura 6	Efeitos do G-CSF que sustentam sua ação na tolerância central e periférica.	28
Figura 7	Representação esquemática da ação direta e indireta do G-CSF sobre o tecido cardíaco promovendo modulação da resposta inflamatória local em modelo de CChC experimental.	83

LISTA DE ABREVIÇÕES

AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
A-V	Átrio-ventricular
BMSC	Células-tronco da medula óssea
BSA	Albumina de soro bovino
CChC	Cardiopatia Chagásica Crônica
CD	Células dendríticas
cDNA	DNA complementar
CSF	Fator estimulador de crescimento de colônias
CT	Células-tronco
Cx43	Conexina 43
CXCR	Receptor de quimiocina CXC
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECG	Eletrocardiografia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPO	Eritropoietina
FDA	Órgão regulador da administração de alimentos e medicamentos norte-americano
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
G-CSFR	Receptor do G-CSF
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HE	Hematoxilina e Eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
IC	Insuficiência cardíaca
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
JAK	Proteína janus quinase
Kda	QuiloDalton
LPS	Lipopolisacarídeo
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
NK	Célula matadora natural
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Solução tampão fosfato
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorido
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SDF-1	Fator derivado do estroma 1
SMA	Actina de músculo liso
STAT	Fator de transdução e ativação da transcrição
TGF-β	Fator transformador do crescimento β
Th	Linfócito T auxiliar

TMB	Tetrametilbenzodine
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulatório
TUNEL	Ensaio de marcação de desoxinucleotidiltransferase terminal dUTP
VCO₂	Produção de dióxido de carbono
VO₂	Consumo de oxigênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
	OBJETIVOS	32
2	CAPÍTULO I	33
2.1	INTRODUÇÃO.....	34
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.3	RESULTADOS.....	36
2.4	DISCUSSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS	40
3	CAPÍTULO II.....	42
3.1	INTRODUÇÃO.....	45
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.3	RESULTADOS.....	53
3.4	DISCUSSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS	71
4	DISCUSSÃO GERAL	77
5	CONCLUSÕES	85
6	REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, uma antropozoonose antes restrita às Américas, tem impacto sanitário e socioeconômico significativo no continente americano. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2002 indicam a presença de 17 a 18 milhões de indivíduos infectados no mundo, porém, números recentes da própria OMS (2010) estimam a redução nesse número para aproximadamente 10 milhões de pessoas infectadas. De acordo com Siqueira-Batista e colaboradores (2011), as ações de controle da doença de Chagas desenvolvidas ao longo do século XX, especialmente a redução da transmissão vetorial em diversos países latino-americanos, têm permitido a transição epidemiológica ao menos em determinadas regiões do continente, sendo observada tendência à queda do número de casos em alguns países, tais como Argentina, Brasil, Chile, Uruguai e Venezuela, justificando a redução do número de infectados. A implantação de programas de controle da transmissão vetorial e em bancos de sangue foi responsável pela redução da morbidade e mortalidade decorrente da forma crônica da doença. Entretanto, a OMS alerta que ainda existem cerca de 25 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção na América Latina e, mesmo que a transmissão fosse interrompida, restariam milhões de pacientes com doença de Chagas sob o risco de morte. Desses pacientes, dois milhões se encontram na fase crônicasintomática da doença de Chagas e correm risco de irem a óbito pela falta de acesso a ferramentas adequadas para o diagnóstico e o tratamento desta doença (MONCAYO, 2003; WHO, 2010).

No ano de 2009 foi comemorado o centenário da descoberta da tripanosomíase americana por Carlos Chagas, que descreveu o agente etiológico, o vetor, os sinais clínicos em humanos e, ainda, espécies animais que funcionam como reservatórios naturais da doença. A importância médica dos triatomíneos como vetor da doença de Chagas é reconhecida, possuindo a família Reduviidae, subfamília Triatominae, mais de cem espécies das quais várias são vetores ou vetores potenciais da doença, sendo as espécies de maior importância na transmissão vetorial o *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. sórdida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (GARCIA, GONZALEZ&AZAMBUJA, 2000). Embora a doença de Chagas tenha sido descrita pela primeira vez em 1909, um estudo recente realizado por paleoparasitologistas revelou a presença de DNA de *T. cruzi*

em múmias colombianas de cerca de 9000 anos de idade, mostrando que essa é uma doença que aflige a população humana há milhares de anos (ARAÚJO et al., 2009). Em decorrência de migrações populacionais, a doença de Chagas, classicamente considerada como uma enfermidade rural passou a atingir centros urbanos (COSTA & LORENZO, 2009).

1.1.1 O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um hemoflagelado pertencente à família Trypanosomatidae cuja principal característica é a presença de flagelo e de uma mitocôndria modificada denominada cinetoplasto (SOUZA, 2000). A observação, por microscopia óptica, do parasito permite a identificação de três formas evolutivas bem definidas, de acordo com a posição flagelar: tripomastigota e amastigota durante seu ciclo de vida nos hospedeiros mamífero e invertebrado, e a forma epimastigota no tubo digestivo do vetor. A figura 1 ilustra o ciclo do *T. cruzi* tanto no hospedeiro invertebrado quanto no vertebrado, representando suas formas evolutivas. A forma epimastigota se multiplica por divisão binária no trato gastrointestinal do triatomíneo e se diferencia na forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectante do hospedeiro vertebrado. Esta é eliminada junto com as fezes e urina do vetor triatomíneo, sobre a pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, podendo penetrar através do local da picada ou mucosas e invadir células nucleadas. No interior das células do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam na forma amastigota, que se replica por fissão binária. Após alguns ciclos de multiplicação, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, ocorrendo então o rompimento das células e liberação dos parasitos para o meio extracelular ou na corrente sanguínea, podendo assim migrar e invadir novas células do hospedeiro ou serem sugados pelo inseto vetor, reiniciando o ciclo do parasito (DIAS & COURA, 1997; BRENER, ANDRADE & BARRAL-NETO, 2000).

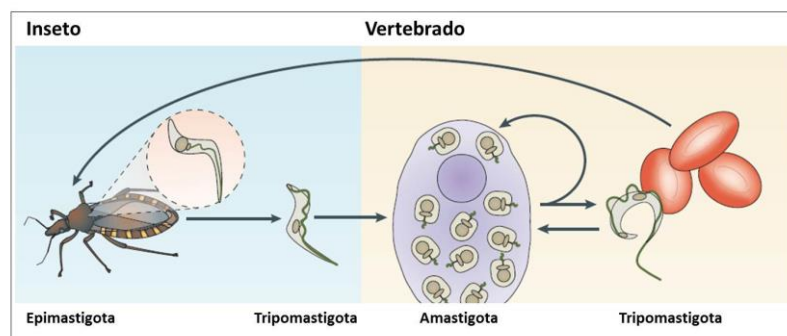


Figura 1. Representação esquemática das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro invertebrado e vertebrado.

Fonte: Adaptada de Buscaglia et al., 2006.

1.1.2 Formas clínicas

A interação parasito-hospedeiro é bastante dinâmica na doença de Chagas, sendo o resultado da associação de fatores múltiplos relacionados ao *T. cruzi*, tais como a cepa, a virulência e o tamanho do inóculo, assim como a características do hospedeiro (seres humanos), como idade, sexo e raça, além de fatores ligados ao ambiente, como condição física da habitação e o grau de preservação do ambiente natural. De uma maneira geral, após a infecção pelo *T. cruzi* em humanos, há o desenvolvimento da fase aguda da doença, muitas vezes subclínica, que é transitória e caracterizada por parasitemia patente, onde são encontradas formas tripomastigotas no sangue periférico e formas amastigotas se multiplicando intracelularmente (BRENER, ANDRADE & BARRAL-NETO, 2000). No local da picada pode-se desenvolver uma lesão volumosa, o *chagoma*, local eritematoso e edematoso, se a picada for perto do olho é frequente a conjuntivite com edema da pálpebra, também conhecido por sinal de Romaña (PUNUKOLLU et al., 2007; DUTRA et al., 2009). A duração da fase aguda é, em média, de 2 a 4 meses, e pode ocorrer o aparecimento de outros sintomas, tais como febre, linfadenopatia, anorexia, hepatoesplenomegalia, miocardite brandas e, mais raramente, meningoencefalite (PUNUKOLLU et al., 2007; MAYA et al., 2010; PARKER & SETH, 2011).

Dos indivíduos infectados cronicamente pelo *T. cruzi*, cerca de 70% são assintomáticos e não apresentam alteração cardíaca ou digestiva. Estes pacientes apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas relevantes. Como esses pacientes não exibem alterações eletrocardiográficas significativas ou dilatação do coração, esôfago ou cólon, observado no exame de raios-X, em geral são diagnosticados apenas por triagem em banco de sangue por apresentar testes sorológicos positivos para o *T. cruzi*. Os indivíduos infectados evoluem, em cerca de 30% dos casos, para uma forma sintomática, que apresenta sintomas cardíacos e/ou digestivos. Desses pacientes, cerca de 8-10% desenvolvem a forma digestiva da doença de Chagas, com dilatação do esôfago e cólon e é, supostamente, o resultado da destruição neuronal do trato gastrointestinal (DUTRA, ROCHA & TEIXEIRA, 2005). Os 20-25% restantes evoluem para um acometimento cardíaco de maior ou menor gravidade,

desenvolvendo, em graus clínicos variados, a cardiomiopatia chagásica crônica (CChC) que é a principal causa de morte em indivíduos chagásicos (DIAS & COURA, 1997).

Na figura 2 são ilustradas algumas imagens de alterações patológicas encontradas em pacientes com CChC com forma cardíaca ou com mega-síndromes. A CChC pode ocorrer em períodos que variam de 5 a 30 anos após a infecção primária e é caracterizada por uma resposta inflamatória intensa e destruição progressiva do tecido cardíaco, causando anormalidades da condução cardíaca e arritmias (DIAS & DIAS, 1989). O aneurisma apical é característico da cardiopatia chagásica, secundário ao comprometimento do sistema de condução, pela presença de áreas inativadas ou áreas aonde o estímulo elétrico chegaria com atraso, as quais ficariam mais susceptíveis aos efeitos da pressão intraventricular durante a sístole (ANDRADE, 1983). Paralelamente, ocorre o afinamento progressivo do músculo cardíaco, com dilatação das cavidades do coração, tendo como consequência a insuficiência cardíaca (IC) – incapacidade de bombear adequadamente o sangue para o organismo que, frequentemente, tem um curso fatal (PRATA, 2001).

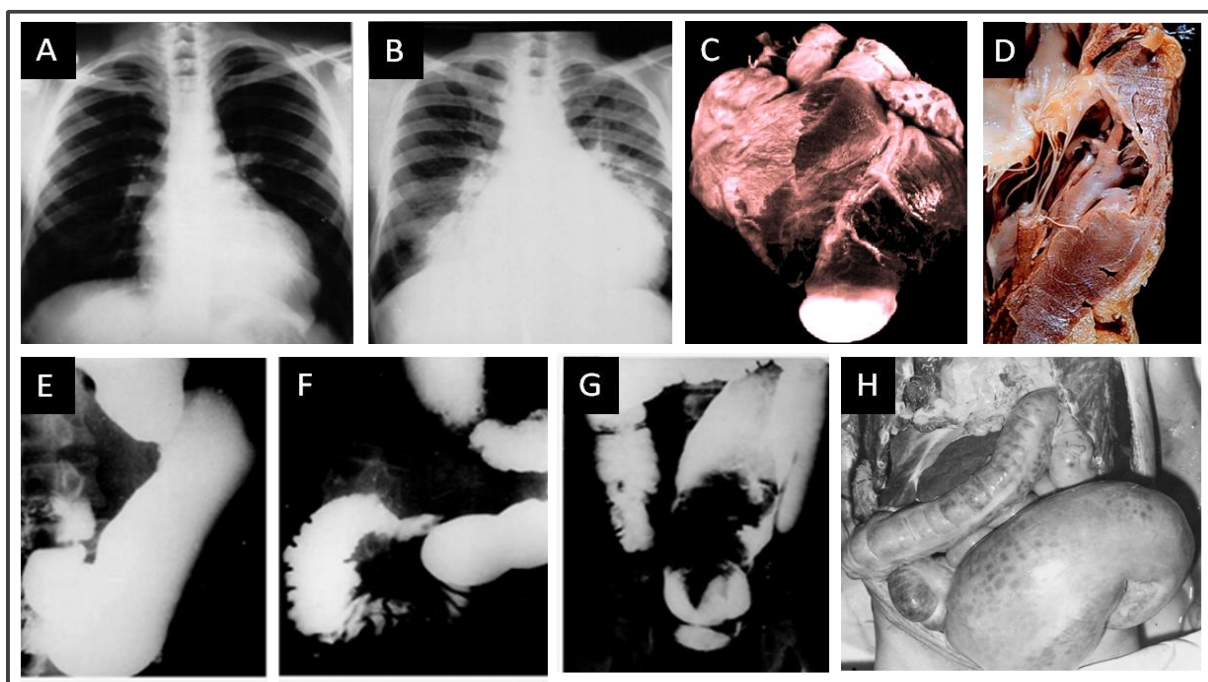


Figura 2.Imagens representativas de alterações patológicas encontradas em pacientes chagásicos crônicos. A) Cardiomegalia moderada; B) Cardiomegalia grave com congestão pulmonar; C) Aneurisma apical; D) Afinamento da parede do ventrículo esquerdo; E) Megaesôfago e megaestômago; F) Megaesôfago e megaduodeno; G e H) Megacólon.

Fontes:Higuchi et al.,2003; Tarleton et al.,2007; Coura & Borges-Pereira, 2010;

<http://www.isradiology.org>; <http://www.fiocruz.br/chagas>.

1.1.3 Imunopatogênese

Todos os organismos vivos possuem mecanismos adaptativos para responder a estímulos agressivos no sentido de manter o equilíbrio homeostático. Esta resposta complexa inclui uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas, coletivamente denominada inflamação, sendo sua principal função o encaminhamento de leucócitos à lesão e ativação para que desempenhem suas funções normais de defesa do hospedeiro (KUMAR, ABBAS& FAUSTO, 2005). Na doença de Chagas não é diferente, e durante a fase aguda da doença há forte ativação da resposta imune inata como sendo a primeira linha de defesa contra a invasão do microorganismo, com participação de macrófagos, células natural killer (NK), eosinófilos e mastócitos (BRENER &GAZZINELLI,1997; JANEWAY et al, 2001). As células ativadas do sistema fagocítico mononuclear iniciam a cascata de eventos de fase aguda, secretando, citocinas da família da interleucina (IL) -1 e do fator de necrose tumoral (TNF). Estas moléculas têm ação pleiotrópica, tanto a nível local como sistêmico, estimulando a produção de IL-6 e IL-8 e das proteínas inflamatória de macrófago 1(MIP-1/CCL3) e quimiotática (MCP/CCL2) de monócitos, além de aumentar também a própria síntese de IL-1 e TNF (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2007; BAUMANN & GAULDIE, 1994). O TNF e a IL-1, sinergisticamente ativam a ciclooxigenase 2 com geração de prostaglandina E2, capaz de causar vasodilatação e aumento da percepção da dor, além de aumentarem a expressão do fator tecidual e fator ativador de plaquetas (PAF), aumentando o risco de distúrbios de coagulação.

Na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, as respostas imune inata e adaptativa coordenadas, efetuadas por macrófagos, linfócitos B e linfócitos T tendem a controlar a parasitemia na fase aguda da doença. As células do sistema fagocítico mononuclear, os monócitos e macrófagos, são fundamentais no controle do parasito no sangue e nos tecidos. Entretanto, apesar de servirem como células efetoras do sistema imune, realizando a fagocitose, servem também como células hospedeiras responsáveis pela disseminação do parasito. Após a ativação linfocitária, os macrófagos se tornam elementos fundamentais no controle do parasito, através da produção de citocinas pró-inflamatórias e substâncias microbicidas. As células NK possuem papel fundamental no controle da infecção por ser fonte primária inicial de interferon- γ (IFN- γ) na fase inicial da infecção, aumentando a síntese de IL-12 por macrófagos. A IL-12 estimula a produção de IFN- γ e induz a diferenciação de linfócitos T helper (Th) 0 em Th1, promovendo maior resistência a infecção aguda (REED et al.,1994). No homem, bem como em modelos experimentais, a infecção pelo *T. cruzi* mobiliza diferentes compartimentos do sistema imune, induzindo

respostas humorais e celulares específicas contra o parasito (BRENER & GAZZINELLI, 1997). A estimulação da resposta imune é crucial na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o agravamento dos sintomas clínicos.

A fase crônica sintomática do processo inflamatório se caracteriza pela presença de infiltrado celular mononuclear, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, levando a destruição tecidual (Figura 3) pela persistência do agente nocivo, das células inflamatórias ou ambos. Já na forma indeterminada há a formação de um ambiente regulador que proporciona o equilíbrio dinâmico entre a resposta inflamatória protetora e o parasito de maneira a restringir a lesão tecidual. A compreensão dos mecanismos relacionados ao estabelecimento de diferentes formas clínicas da doença de Chagas é um ponto crucial para nortear futuras intervenções profiláticas ou terapêuticas. Apesar dos processos que levam ao desenvolvimento da forma crônica da doença não estarem completamente esclarecidos, é indiscutível o papel da resposta inflamatória na CChC (ANDRADE, 1983; MORRIS et al., 1990). Histologicamente, a CChC é caracterizada pela presença de infiltrados de células mononucleares compostos por macrófagos, células B, e células T, frequentemente aderidas a miócitos e que induzem a miocitólise (DIAS & COURA, 1997). Vários estudos indicam a participação de linfócitos Th1 e produção aumentada de IFN- γ , semelhante a uma reação de hipersensibilidade tardia (SOARES et al., 2001; DUTRA, ROCHA & TEIXEIRA, 2005). De fato, a associação entre progressão para formas crônicas cardíacas e a produção aumentada de IFN- γ foi observada em pacientes chagásicos, bem como uma diminuição na produção de IL-10 (CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003).

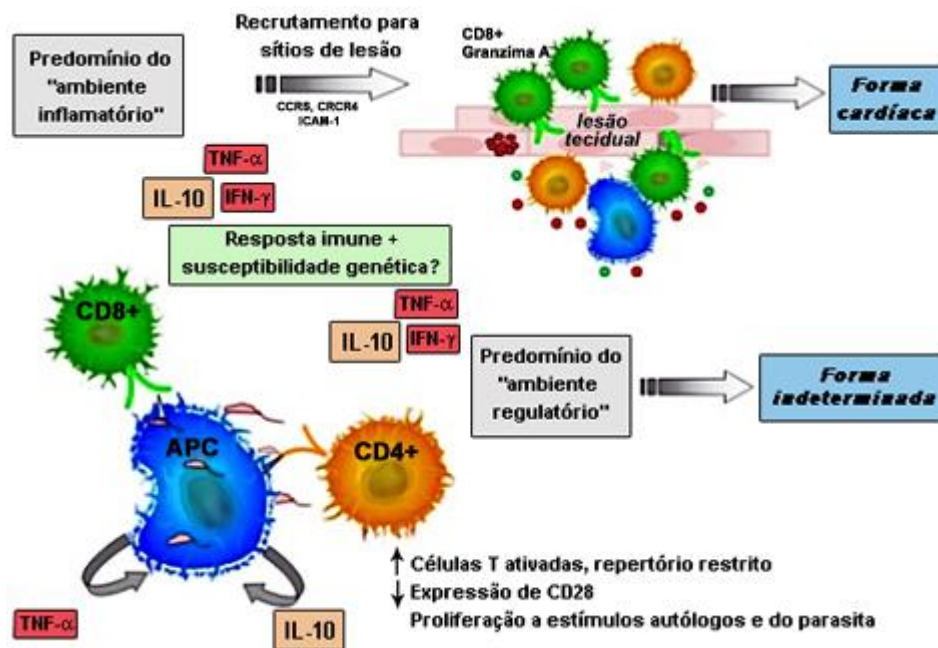


Figura 3. A resposta imune nas formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=170>

Durante algum tempo, acreditava-se na ausência de parasitos teciduais durante a fase crônica da doença (HIGUCHI, 1999), porém os avanços de técnicas de biologia molecular permitiram a detecção da presença do DNA do *T. cruzi* em biópsia de corações humanos (AÑEZ et al., 1999; BENVENUTI et al., 2008), indicando que a persistência do parasito pode ser um fator importante para o desenvolvimento da CChC. A presença do parasito ou de seus antígenos indefinidamente nos tecidos do hospedeiro estimula constantemente a resposta imune específica, desencadeando o processo inflamatório exacerbado com conseqüentes efeitos deletérios ao hospedeiro. Tanto a resposta imune ao *T. cruzi* quanto a auto-reatividade a componentes cardíacos já foram apontadas como possíveis mecanismos desencadeadores do processo patológico observado na CChC (SOARES, PONTES-DE-CARVALHO & RIBEIRO-DOS-SANTOS, 2001; KIERSZENBAUM, 2003; DUTRA, ROCHA & TEIXEIRA, 2005), mas nenhuma se mostrou suficiente para explicar cada caso. Tem sido dada atenção especial à hipótese do mimetismo molecular, onde a presença de auto-anticorpos que reagem contra antígenos cardíacos, como os receptores β 1 adrenérgico e M2 muscarínico por homologia a antígenos do *T. cruzi*, promovem anormalidades na condução elétrica no coração (BORDA et al., 1984; STERIN-BORDA et al., 1991; CUNHA-NETO, 1995; MASUDA et al., 1998; HERNANDEZ et al., 2003; MACIEL et al., 2012). Rocha e colaboradores (2006) sugerem que a infecção crônica pelo *T. cruzi* promove alterações na densidade desses receptores

cardíacos, que em conjunto com a fibrose observada, promovem distúrbios de condução cardíaca.

A análise da expressão diferencial de extensa quantidade de genes por microarranjo de DNA em corações de animais chagásicos crônicos demonstrou que a infecção crônica pelo *T. cruzi* induz produção aumentada de diversos genes associados ao processo inflamatório e a fibrose em si, quando comparados aos animais normais, evidenciando a importância tanto da inflamação quanto da fibrose na patogênese da CChC (SOARES et al., 2010, 2011). Além do próprio dano causado pela infecção do *T. cruzi* em células cardíacas e a persistência da estimulação antigênica que mantém a resposta imune local, a hipótese neurogênica também é proposta como agravante dos distúrbios de condução apresentados por pacientes com CChC. Segundo essa hipótese, a desnervação autonômica devida à destruição de células ganglionares parasimpáticas no coração causaria os distúrbios cardíacos apresentados, porém esses dados são controversos, já que não há correlação entre a lesão neuronal cardíaca e as manifestações clínicas da doença (MARIN-NETO et al., 1999).

A existência de epítomos antigênicos compartilhados entre o *T. cruzi* e células mamíferas é bem descrita na literatura, sugerindo a quebra de tolerância por reatividade cruzada por componentes do hospedeiro, como miosina cardíaca, receptor adrenérgico $\beta 1$ e muscarínico M2 (RIZZO, CUNHA-NETO & TEIXEIRA, 1989; CUNHA-NETO et al., 1995; CUNHA-NETO et al., 1996; ROCHA et al., 2006). Para comprovar a reatividade cruzada entre antígenos do parasito e antígenos cardíacos, Girones & Fresno (2003) purificaram células T de animais infectados com *T. cruzi* e as injetaram em camundongos singenéticos não-infectados, observando o desenvolvimento de uma cardite semelhante à encontrada nos animais chagásicos, relacionada com a interação dessas células T ativadas e antígenos cardíacos. Desta forma, o *T. cruzi* deve funcionar como um gatilho, sendo capaz de estimular a resposta imunológica através da presença de parasitos ou de seus peptídeos imunogênicos que iniciariam o processo inflamatório.

1.1.4 Tratamento da doença de Chagas

1.1.4.1 Quimioterápicos

A doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada, assim como a malária, a dengue e a leishmaniose, apresentando-se como um grave problema de saúde pública. Embora exista financiamento para pesquisas relacionadas a essas doenças,

infelizmente o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas (FRANCO-PAREDES, BOTTAZZI & HOTEZ, 2009; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). Segundo o Ministério da Saúde (2010), uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo potencial reduzido de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de renda baixa e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento. As doenças negligenciadas não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento (de MEIS et al., 2009). Os custos associados à doença de Chagas são variáveis nos diferentes países devido às diferenças nos custos de atendimento médico. Como ela é uma doença debilitante e incapacitante e que em geral os pacientes chagásicos são de nível socioeconômico menos privilegiado, os custos de atendimento acabam recaindo sobre o estado (SCHMUÑIS, 2000).

O fato da doença de Chagas ser uma doença negligenciada é ilustrado pela falta de novas drogas, já que por mais de três décadas, somente dois medicamentos, nifurtimox e benzonidazol, foram disponibilizados para seu tratamento (MARIN-NETO et al., 2009). Segundo Costa e colaboradores (2011), nenhum destes compostos é ideal por que: (i) não são ativos durante a fase crônica da doença e apresentam sérios efeitos colaterais, (ii) requerem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica, (iii) há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasito a ação destas drogas, (iv) populações de parasitos resistentes a ambos compostos têm sido relatadas, (v) apresentam alto custo, e (vi) não há formulações pediátricas. Esses compostos apresentam mecanismos de ação citotóxicos, que inicialmente envolvem uma ou mais reações de redução do grupo nitro, seguida por inibições de várias enzimas, que são necessárias às exigências energéticas do parasito e produção de radicais livres (TROSSINI, 2004). No entanto entre os dois quimioterápicos, o nifurtimox (Lampit, Bayer 2503) por produzir metabólitos de oxigênio reduzidos altamente tóxicos, não é mais utilizado em diversos países, incluindo o Brasil. O benzonidazol se torna, portanto, o medicamento de escolha utilizado para o tratamento da Doença de Chagas, cuja ação tripanocida é capaz de eliminar o parasito quando administrado durante a fase aguda da doença, curando cerca de 75% dos pacientes tratados (SOSA-ESTANI & SEGURA, 1999; RASSI et al., 2007; MARIN-NETO et al., 2009).

Apesar da doença de Chagas ser de notificação compulsória (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005), muitas vezes os sintomas de fase aguda são confundidos com um simples resfriado, não sendo o paciente diagnosticado nessa fase, o que proporciona o desenvolvimento da fase crônica, dificultando o seu tratamento (BILATE & CUNHA-NETO, 2008). Como o benzonidazol tem ação tripanocida, e na fase crônica da doença não há muitos parasitos circulantes, sua utilização após a fase aguda da doença foi questionada por muito tempo (BRITO et al., 2001; CANÇADO et al., 2002; CALDAS et al., 2008). Uma das primeiras publicações sugerindo a importância dessa droga na melhora da CChC foi descrita por Garcia e colaboradores (2005), que demonstraram uma relação direta entre a diminuição do parasitismo tecidual e a diminuição do infiltrado inflamatório e do percentual de área ocupada por tecido fibrótico, bem como uma melhora funcional, avaliado por eletrocardiografia e ergoespirometria, em animais tratados com benzonidazol em fase crônica. Recentemente foi iniciado um estudo internacional, multicêntrico e duplo-cego, visando avaliar a eficácia da utilização do benzonidazol na fase crônica da doença de Chagas (MARIN-NETO et al., 2009).

1.1.4.2 Tratamento da insuficiência cardíaca

Uma vez que a grande maioria dos pacientes não é tratada durante a fase aguda da doença de Chagas, os pacientes que evoluem para a fase crônica sintomática precisam de tratamento que, apesar de não ser capaz de reverter as causas das alterações cardíacas, é importante para o retardo da progressão da CChC. O tratamento da insuficiência cardíaca crônica é voltado para o alívio dos sintomas e melhora da qualidade de vida do paciente, envolvendo medidas não-farmacológicas, farmacológicas e cirúrgicas, dependendo do estágio da síndrome. A identificação da etiologia e a remoção da causa subjacente são o tratamento mais desejável, como a correção cirúrgica de malformações congênitas ou o tratamento da hipertensão arterial, o que não é possível com a IC de etiologia chagásica. O tratamento medicamentoso tem apresentado evidências consistentes de redução da morbimortalidade desses pacientes. Aconselhamento, instruções de saúde e programas de avaliação constante ajudam os pacientes a se tratar e a lidar com seu regime de tratamento (PORTH, 2004).

Entre as medicações usadas no tratamento da IC, estão os diuréticos, digoxina, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e β -bloqueadores. De acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da Insuficiência Cardíaca, revisada em 2002, os inibidores ECA são o grupo de fármacos de

maior importância, sendo extensa a lista de inibidores da ECA disponíveis para uso clínico, incluindo captopril, enalapril e quinapril, dentre outros. A IC acarreta a diminuição do fluxo sanguíneo renal, causando aumento da produção de renina pelos rins, juntamente com o aumento da concentração de angiotensina II, contribuindo para vasoconstrição excessiva e conseqüente aumento da pressão arterial. A angiotensina II também proporciona a regulação da pressão arterial à longo prazo, pois estimula a produção de aldosterona pela supra-renal, com aumento da retenção de sal e água pelos rins (GUYTON, 1988). Ambos os mecanismos tornam maior a carga de trabalho do coração, justificando a terapia com inibidores da ECA para aliviar os sintomas e aumentar a sobrevivência do paciente.

Os digitálicos permanecem como o agente mais comumente prescrito para o tratamento da ICC e modulam a ativação neuro-hormonal, reduzem a atividade simpática e estimulam a ação vagal, diminuindo a frequência cardíaca. Os diuréticos são outra classe de medicamento usada para redução de volume intravascular, do volume ventricular, da pré-carga e conseqüentes sintomas da IC, sempre em associação com um inibidor da ECA. Outra ação terapêutica é a utilização de bloqueadores β -adrenérgicos, a fim de inibir a ativação simpática e os níveis plasmáticos elevados de noradrenalina que desempenham papel primário na progressão da IC. Os agentes vasodilatadores tendem a melhorar o desempenho cardíaco, sendo também usado na IC. De qualquer forma, todos esses tratamentos são paliativos na IC de etiologia chagásica já que nos pacientes que evoluem para a forma crônica da doença, há persistência da resposta inflamatória e progressão da destruição do músculo cardíaco (BARRETO et al., 2002).

O transplante cardíaco constitui, na atualidade, a modalidade de tratamento estabelecida para os pacientes com IC grave e refratária ao tratamento clínico otimizado. Em 1968, Zerbini & Decourt realizaram o primeiro transplante cardíaco da América Latina e o décimo sétimo no mundo, em um paciente com miocardiopatia dilatada. O desconhecimento técnico sobre a rejeição e a ausência de medicações eficazes para seu controle, associada a complicações infecciosas levaram ao descrédito crescente do procedimento em virtude de resultados desfavoráveis (FIORELLI et al., 2008). Ao longo do tempo os resultados dos transplantes cardíacos foram gradativamente melhorando, com o refinamento das técnicas e das drogas utilizadas para imunossupressão do paciente, com diminuição do risco de rejeição. Entretanto, nos pacientes chagásicos, a utilização de imunossupressores implica no agravante de uma possível reagudização da doença, pela redução da resposta imune e aumento conseqüente da parasitemia (BOCCHI et al., 1996;

PARKER & SETH, 2011). Apesar do grande êxito alcançado durante a realização dos transplantes, o grande limitante – no Brasil e no mundo – é a pouca disponibilidade de doadores de órgãos. O Brasil dispõe do maior programa público de transplantes do mundo, com taxa de 5,4 doadores por milhão de habitantes/ano e aumento expressivo do número de transplantes, entretanto, existem mais de 70 mil brasileiros ainda na fila de espera de doação de órgãos (MARINHO, 2004; MATTIA et al., 2010). Por essa razão, há um grande número de pesquisas relacionadas ao tratamento da IC que não envolvem o transplante cardíaco (HELITO et al., 2009).

1.2 A TERAPIA CELULAR

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas com capacidade de auto-renovação por toda a vida e de diferenciação em um ou mais tipos celulares especializados. De acordo com a sua capacidade de se diferenciar em todos, muitos ou alguns tipos celulares diferentes, quando estimuladas, as CT podem ser nomeadas como totipotentes, pluripotentes, ou multipotentes, respectivamente (KRAMPERA et al., 2007). Quanto mais indiferenciada a célula for, maior será sua plasticidade e conseqüente potencial de diferenciação (ORLIC, 2004). Elas podem ser classificadas em três grandes categorias de acordo com seu estágio de desenvolvimento, como embrionárias, fetais ou adultas (THOMSON et al., 1998). De maneira distinta das CT embrionárias, que são definidas pela sua origem, as CT adultas, embora mantenham a capacidade de diferenciação em tipos celulares diversos e de auto-renovação, carecem de melhor caracterização.

A manutenção do comportamento das CT depende de reguladores autônomos próprios, intrínsecos das células, que são modulados por sinais externos ou do microambiente. O controle intrínseco inclui proteínas responsáveis pela regulação de fatores nucleares envolvidos na modulação da expressão gênica da célula (BONNET, 2002). Desta forma, as células progenitoras estão sob forte influência de citocinas, cada uma apresentando ações múltiplas mediadas por receptores que sinalizam desde a sobrevivência, diferenciação, maturação até sua ativação (ABBAS, LICHTMAN & PILAI, 2007; HELD & GUNDERT-REMY, 2009). Entre as CT adultas, encontramos as hematopoiéticas e as mesenquimais. As CT hematopoiéticas apresentam um potencial proliferativo elevado, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens sanguíneas e a reconstituição da população hematopoiética a partir de uma única célula.

Com seu potencial elevado de diferenciação, as CT possibilitam a produção de células especializadas que não são rejeitadas nos transplantes autólogos, por serem oriundas do próprio receptor. Essas células são usadas na chamada medicina regenerativa, permitindo ao próprio organismo reparar tecidos e órgãos lesados (DOMEN, WAGERS & WEISSMAN, 2006). Podemos constatar a ideia da pluripotência das CT de medula óssea através do trabalho publicado por Deb e colaboradores (2003), os autores observaram a presença de cardiomiócitos diferenciados a partir de células transplantadas da medula óssea, evidenciados pela presença do cromossomo Y nestas células, em biópsias de coração de pacientes do sexo feminino que receberam células de medula óssea de doadores do sexo masculino.

Alguns dos alvos terapêuticos foram órgãos considerados por muito tempo como incapazes de desenvolver quaisquer processos de regeneração, como o cérebro e o coração. Dessa forma, foram abertas perspectivas inovadoras para o tratamento de doenças crônico-degenerativas, como a doença de Chagas. As CT migram por quimiotaxia em direção ao estímulo lesivo, onde fatores, tais como citocinas, fatores de crescimento e de proliferação celular, são secretados pelas células. O contato célula-célula, ou interação da célula com a matriz extracelular mediada por moléculas de adesão e quimiocinas também são fatores importantes que irão determinar não só a migração dessas células como também a permanência delas nos seus microambientes particulares (WATT et al, 2000; KIROUAC et al, 2009). Em modelos experimentais de cardiopatia tem sido demonstrado o papel promissor das células de medula óssea na promoção de neovascularização, formação de cardiomiócitos e melhora funcional do coração em animais tratados (ORLIC et al, 2001; KOCHER et al, 2001; TOMA et al, 2002; ASSMUS et al, 2002; ROTA et al.,2007).

Nos últimos anos as CT mesenquimais têm merecido destaque, pois podem ser isoladas de praticamente todos os tecidos adultos e preservam as suas características após um cultivo padrão, além de apresentarem propriedades imunomodulatórias como as CT hematopoiéticas (GUIMARÃES, 2010). Hoje existem evidências que as CT mesenquimais estão presentes em diversos tecidos e órgãos do indivíduo adulto, tais como a pele, o fígado, a polpa de dente de leite, o sangue do cordão umbilical, o tecido adiposo, o sangue menstrual, entre outros (POULSOM et al., 2002; BONNET, 2002; CASE et al., 2008; WILSON, BUTLER & SEIFALIAN, 2010; GUIMARÃES et al., 2010; MARUYAMA et al.,2010). Diversos autores demonstraram que células já diferenciadas podem proliferar em resposta a agressões teciduais, indicando que o processo de regeneração ocorre também a partir do próprio tecido, dependendo do estímulo recebido

(PITTENGER et al., 1999; KRAUSE, 2002; QUAINI et al.,2002; LERI et al.,2002; LONGO et al.,2010). Steele e colaboradores (2005), por exemplo, demonstraram a capacidade, do que ele chamou de células semelhantes a progenitoras cardíacas, têm de serem mobilizadas e migrarem para a área da lesão induzida.

O primeiro trabalho demonstrando a possibilidade de utilização das CT hematopoiéticas na regeneração do miocárdio em modelo murino de lesão isquêmica foi apresentado por Orlic e colaboradores (2001). A partir de então, diversos estudos comprovaram a capacidade dessas células em reparar o tecido cardíaco (KOCHER et al.,2001, WANG et al.,2001, TOMA et al.,2002). Os resultados de estudo realizado em modelo animal de cardiopatia chagásica crônica demonstraram que o transplante com células mononucleares da medula óssea proporcionou a melhora da função cardíaca, com redução de inflamação e fibrose, sugerindo a possibilidade de utilização da terapia celular na doença de Chagas (SOARES et al., 2004). A partir desses e de outros dados experimentais, foram realizados estudos clínicos de fase I e II, para investigar os efeitos do transplante autólogo de células da medula óssea em pacientes com insuficiência cardíaca com etiologia chagásica. Os resultados apresentados demonstraram tanto a ausência de efeitos adversos quando a melhora funcional desses pacientes até sessenta dias pós-transplante, com aumento da distância percorrida em 6 minutos, aumento da fração de ejeção ventricular esquerda, mostrando que além da segurança do procedimento, existiam potenciais benefícios associados à terapia (VILAS-BOAS et al.,2004; VILAS-BOAS et al.,2006; VILAS-BOAS et al.,2011).

No entanto, os resultados do primeiro estudo clínico randomizado em pacientes chagásicos crônicos que realizaram transplante autólogo com células mononucleares da medula óssea foram discordantes dos resultados relatados anteriormente por Vilas-Boas e colaboradores. Nesse estudo foram analisados 234 pacientes entre julho de 2005 e outubro de 2009, que receberam o transplante ou que participaram como grupo controle, sem a injeção de células nas coronárias, não havendo diferença entre os grupos tanto na função cardíaca quanto na avaliação de questionários de qualidade de vida (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2012). Dessa maneira, apesar de promissora, a terapia celular ainda carece de aprimoramento, como por exemplo, a padronização do número de células, a via de administração e investigação dos seus mecanismos de ação.

1.30 FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS (G-CSF)

1.3.1 O G-CSF na resposta imune inata

O G-CSF é uma glicoproteína com peso molecular de 24-25 kDa que consiste de quatro α -hélices antiparalelas (Figura 4), contendo uma molécula de ácido neuramínico e, no mínimo, uma ponte dissulfeto interna, necessária para sua atividade biológica (DEMETRI & GRIFFIN, 1991). O G-CSF recombinante humano (Filgrastim) é uma glicoproteína produzida através da tecnologia do DNA recombinante, descrita há mais de vinte anos, que tem seu uso aprovado pelo órgão regulador da administração de alimentos e medicamentos norte-americano (FDA) desde o ano de 1991 (SOLAROGLU et al., 2006; MASET, DUARTE & GRECO, 2007). A proteína recombinante pode ser expressa na forma glicosilada (peguilada) em células da linhagem derivada de ovário de Hamster chinês (CHO) e na forma não-glicosilada, com uma metionina extra na posição N-terminal em *Escherichia coli*. A forma nativa do G-CSF produzida naturalmente é glicosilada, o que confere resistência à degradação por proteases e pode influenciar toda a estrutura da proteína. A glicosilação também parece prevenir a agregação da proteína pelo aumento da solubilidade e estabilidade desta molécula que é altamente hidrofóbica em pH neutro (OH-EDA et al., 1990). Apesar do aumento da atividade no G-CSF peguado, tanto a forma nativa quanto a não glicosilada apresentam atividade biológica.

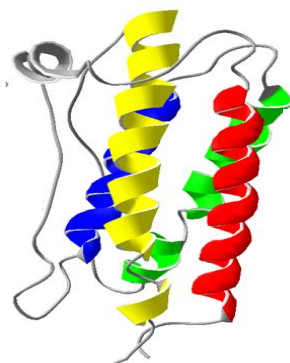


Figura 4. Estrutura do G-CSF recombinante humano determinada por cristalografia.

Fonte: <http://maptest.rutgers.edu/drupal/?q=node/113>

Durante algum tempo acreditava-se que citocinas específicas atuavam induzindo a diferenciação das CT hematopoiéticas ao longo de determinada via. Atualmente parece que cada célula está intrinsecamente predisposta a uma linhagem ou outra, cumprindo as citocinas, o papel de promover a sua sobrevivência (PARSLOW et al., 2004). Na figura 5 são ilustradas algumas citocinas que possuem essa função, dentre elas estão os fatores estimuladores de colônias (CSFs), tais como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), a interleucina 3 (IL-3) e a eritropoietina (EPO) (DEMETRI & GRIFFIN, 1991). Os

vários CSFs não exibem nenhuma relação estrutural entre si e ambos se ligam a receptores distintos, no entanto apresentam ações que se sobrepõem como é o caso do G-CSF e do GM-CSF, sendo o significado biológico dessa redundância ainda não estabelecido (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2007).

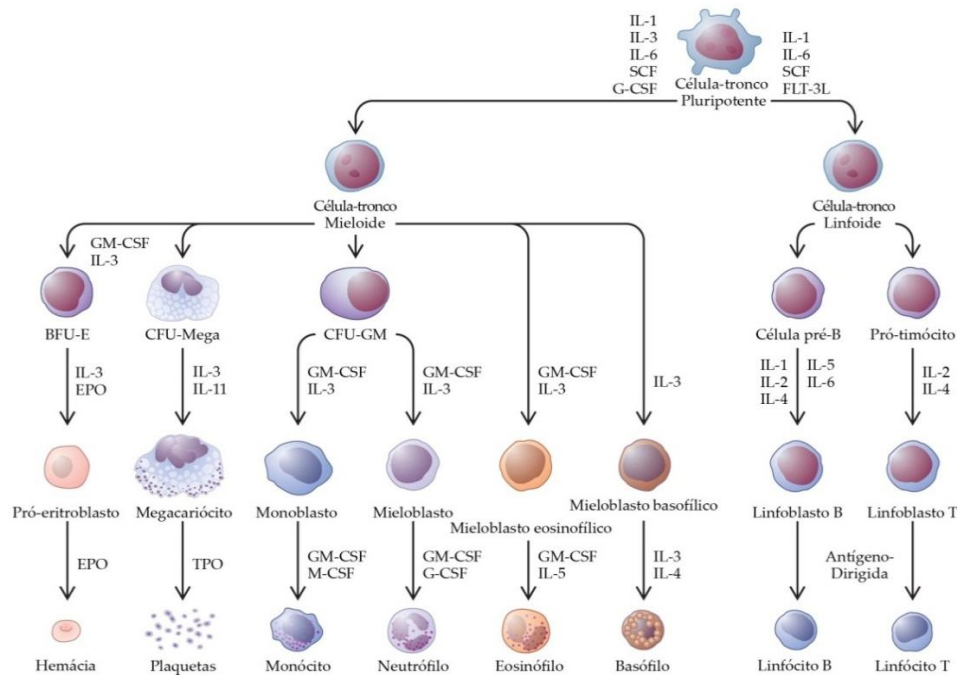


Figura 5. Influência das citocinas durante o desenvolvimento das células sanguíneas na medula óssea.

Fonte: Dale, 2008.

O G-CSF é um polipeptídico inicialmente identificado como fator de estimulação para neutrófilos, capaz de induzir sua proliferação e maturação (DEMETRI & GRIFFIN, 1991). Sua utilização na clínica é bem conhecida para prevenção da granulocitopenia induzida por tratamento, a principal causa de morte entre pacientes com câncer submetidos à quimioterapia ou radioterapia, e a sua administração causa raros efeitos colaterais, tais como náusea, vômito, dor no estômago e sintomas semelhantes aos de um resfriado (DOMEN, WAGERS & WEISSMAN, 2006; HUTTMAN et al, 2006). A terapia com G-CSF, a fim de mobilizar CT da medula óssea, é uma estratégia utilizada na clínica para aumentar a proliferação e a migração dessas células para a circulação com o objetivo de coleta e uso dessas células no transplante de medula óssea autóloga (ANDERLINI et al., 1999; CASHEN et al., 2004; ANDERLINI & CHAMPLIN, 2008).

A habilidade da célula em responder as citocinas depende da presença de receptores para esses fatores na sua superfície. Dessa forma, os efeitos biológicos do G-CSF são mediados via ativação do seu receptor (G-CSFR), um membro da superfamília de

receptores de citocinas tipo I. O receptor de G-CSF humano é conhecido por CD114, sendo expresso primeiramente em progenitores neutrofílicos e granulócitos maduros, transmitindo principalmente sinais de proliferação, diferenciação e sobrevivência destas células (BONEBERG et al., 2000). Também pode ser encontrado em monócitos, com a função de atenuar a liberação de citocinas pró-inflamatórias quando estas células se encontram ativadas e de potencializar a fagocitose, além de ter sido identificado em plaquetas maduras e várias outras células não hematopoiéticas, incluindo células endoteliais e placenta (DEMETRI & GRIFFIN, 1991; BOBER et al., 1995). A expressão do G-CSFR também foi descrita em linfócitos T e B em humanos, após a exposição com o G-CSF, sugerindo a ação dessa citocina na modulação da resposta imune adaptativa (FRANZKE et al., 2003; FRANZKE, 2006).

1.3.2 Regulação da resposta imune adaptativa pelo G-CSF

Muitas rotas de sinalização intracelular se iniciam a partir da interação entre moléculas e seus ligantes, tais como as citocinas e seus receptores de superfície. Essa ligação desencadeia uma cascata de sinais intracelulares direcionadas ao núcleo, onde modulam a transcrição gênica. O receptor de G-CSF está associado à tirosina-quinases citoplasmáticas, chamadas Janus quinases (Jaks) que se autofosforilam e ativam um grupo de proteínas reguladoras gênicas denominadas STATs (fator de transdução e ativação da transcrição) que, nessa condição, migram para o núcleo e estimulam a transcrição de genes-alvo específicos (JANEWAY et al., 2001; ALBERTS et al., 2002; FRANZKE, 2006). Dependendo do conjunto de proteínas fosforiladas, a ligação das STATs nas sequências de DNA alvo proporcionam efeitos diversos, como a ativação de GATA3 e a modulação de linfócitos T por ativação da apoptose via Fas/FasL em linfócitos, já em neurônios e miócitos o G-CSF apresenta efeito antiapoptótico, através do aumento de Bcl2 (REYES et al., 1999; SOLAROGLU et al., 2006; TOH et al., 2009; MILBERG et al., 2011).

Na revisão feita por Franzke (2006) são apontados alguns resultados obtidos em estudos *in vitro*, em modelos experimentais e dados clínicos, que evidenciam o papel do G-CSF na regulação da resposta imune adaptativa, conforme sumarizado na figura 6. Foi observada a redução da proliferação de linfócitos T em sangue periférico de pacientes tratados com G-CSF, após a estimulação por mitógenos *in vitro*. Alguns autores sugerem que esta redução é decorrente da regulação do ciclo celular do próprio linfócito T, enquanto que outros autores sugerem que o G-CSF modula a função de monócitos,

regulando os linfócitos T por ação indireta, por diminuição de moléculas co-estimulatórias, aumento de IL-10 e diminuição na produção de IL-12 e TNF (MIELCAREK et al.,1998; RUTELLA et al., 1998; REYES et al.,1999; RUTELLA et al.,2000; NAWA et al.,2000).

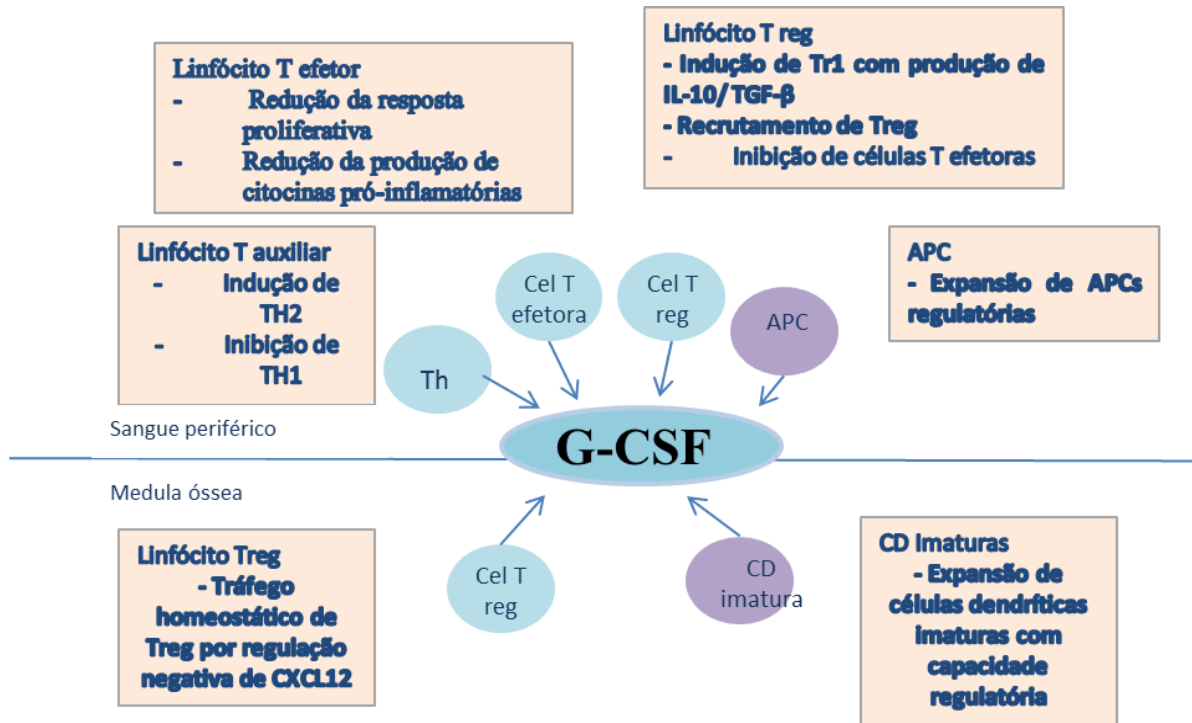


Figura 6. Efeitos do G-CSF que sustentam sua ação na tolerância central e periférica.

Fonte: modificada de Franzke, 2006.

Além de alterar a função de linfócitos T, o G-CSF também exerce efeito modulatório sobre as células dendríticas. As células dendríticas (CD) são células apresentadoras de antígenos profissionais (APC) que têm a capacidade de migrar para diferentes compartimentos corporais através do sistema linfático, e que estão envolvidas com a resposta inicial dos linfócitos T culminando em sua ativação (JANEWAY et al.,2001). De acordo com sua habilidade de induzir a diferenciação de linfócitos T em células efetoras Th1 ou Th2, duas linhagens distintas de células dendríticas têm sido descrita em humanos: a linhagem mielóide (CD1) e a linhagem linfóide (CD2). A CD1, originada de precursores mielóides e que precisam de GM-CSF para sua sobrevivência, produz uma maior quantidade de IL-12 quando estimulada por TNF-α ou CD40L e direciona a diferenciação para Th1, já as células dendríticas linfóides (CD2) são também chamadas de células plasmocitóides e são capazes de induzir a diferenciação de células Th2 após sua ativação (ROBINSON et al.,1999).

Arpinati e colaboradores (2000) demonstraram que o tratamento com G-CSF aumenta seletivamente o número de células CD2 no sangue periférico de pacientes,

induzindo uma maior diferenciação de células Th2, com produção elevada de IL-4 e IL-10. Acredita-se que o estado de ativação/maturação das CDs pode ser um ponto de controle para a indução de tolerância periférica através da modificação do estado de ativação dos linfócitos T. Quanto imaturas, as CDs, não só podem induzir a diferenciação de células Treg, como também podem apresentar antígenos num contexto de expressão de CTLA-4, promovendo um estado tolerogênico (KLANGSINSIRIKUL & RUSSEL, 2002; RUTELLA et al., 2002; AGNELLO et al., 2004; RUTELLA & LEMONI, 2004; VLAD, CORTESINI & SUCIU-FOCA, 2005). Estudos in vitro também demonstraram que o G-CSF tem a capacidade de aumentar a geração de células T regulatórias (Treg) produtoras de IL-10 e TGF- β (RUTELLA et al., 2004).

Sakaguchi e colaboradores (1995) foram os pioneiros a descrever uma população de células caracterizadas pela presença de marcadores de superfície CD4 e CD25, com capacidade regulatória, conhecidas atualmente como Treg naturais. Uma vez que animais atímicos recebiam transplante de uma população de células depletadas dessa subpopulação, os mesmos desenvolviam resposta autoimune grave em diversos órgãos, ao passo que, quando essas células eram transplantadas, suprimiam a doença. As células Treg naturais também expressam o fator de transcrição Foxp3, sendo hoje conhecida a sua capacidade de controle da intensidade da resposta inflamatória, seja contra auto-antígenos, seja contra antígenos estranhos, de modo a evitar lesão tecidual (HSIEH, LEE & LIO, 2012). O envolvimento de tais células tem sido implicado na homeostasia de linfócitos T promovido pelo tratamento com G-CSF, através do controle da resposta imune autoreativa (SAKAGUCHI, 2000).

Diversos estudos sugerem mecanismos de ação múltiplos das células Treg que as possibilitam agir como moduladores da resposta imunológica, sendo organizados em três modelos básicos:

- 1. Dependente de contato célula-célula: supressão da célula-alvo com liberação de fatores de supressão incluindo o monofosfato de adenosina cíclica (AMPC), citocinas supressivas como o TGF- β , citólise direta ou sinalização negativa através da molécula CTLA-4;
- 2. Dependente de fatores de supressão solúveis como citocinas IL-10, TGF- β e IL-35 ou secreção de fatores supressivos pelas APC como adenosina;
- 3. Por competição: competição por citocinas que sinalizam através de receptores da cadeia γ comum (IL-2, IL-4 e IL-7) (READ, MALMSTROM & POWRIE, 2000; SOJKA, HUANG & FOWELL, 2008; de ARAÚJO et al., 2011).

Outra subpopulação de Treg é formada na periferia e é conhecida como Treg induzida, pois seu fenótipo, apesar de não ser o de Treg naturais pela não expressão de CD25 e de foxp3, é funcionalmente o de células capazes de assumir um perfil tolerogênico induzido por TGF- β , IL-2 e ácido retinóico (CHEN et al.,2003; BENSON et al.,2007). Contrastando com as Treg naturais, originadas do timo, as células Tr1 possuem atividade imunoreguladora e são induzidas por estimulação antigênica na periferia de maneira dependente de IL-10. Roncarolo e colaboradores (2006) propõem a utilização da nomenclatura de células Tr1 para todas as células T produtoras de IL-10 que são induzidas pela própria IL-10 a apresentarem atividade regulatória. Linfócitos T CD4⁺ mobilizados com o uso de G-CSF de doadores saudáveis proporcionam in vitro a supressão de resposta proliferativa contra aloantígenos de maneira dependente de contato, produzindo citocinas em um perfil semelhante a Tr1. No entanto, a exposição direta ao G-CSF in vitro não foi capaz de induzir esse mesmo fenótipo Tr1 (NAWA et al., 2000; RUTELLA et al., 2002).

Morris e colaboradores (2004) demonstraram que, apesar dos dados controversos dos experimentos in vitro, a administração de G-CSF em transplante alogênico murino reduziu a reação de rejeição do enxerto x hospedeiro através da produção de IL-10 por LT, provavelmente com o fenótipo Tr1. Independente de qual população de célula imunoreguladora esteja atuando, o tratamento com G-CSF também causou o aumento do número de células T reguladoras, produtoras de TGF- β em modelo animal de diabetes (KARED et al., 2005). Na medula óssea, a expressão do fator derivado do estroma 1 (SDF-1/CXCL12), que é o ligante do receptor CXCR4, possibilita a permanência dessas células nesse compartimento. A terapia com G-CSF proporcionou a redução da expressão de CXCL12, o que está associado com a migração de células Treg da medula para a periferia, a fim de cumprir seu papel na tolerância periférica (ZOU et al., 2004).

1.3.3 O G-CSF e o coração

O uso de fatores de crescimento para mobilização de CT abriu perspectivas novas para o tratamento de doenças crônico-degenerativas com um custo e risco menor haja vista ser esse um tratamento menos invasivo. Dessa forma, as pesquisas envolvendo a terapia com o G-CSF vêm crescendo a fim de avaliar sua participação na modulação da resposta inflamatória e seu envolvimento no reparo tecidual. Dentre os modelos de doenças cardiovasculares que usam o G-CSF para a terapia celular, podemos citar o trabalho de Orlic e colaboradores (2001) que demonstraram a melhora da função ventricular pós-infarto do miocárdio, após o tratamento, resultando na regeneração do músculo cardíaco.

Esse estudo foi uma das primeiras publicações demonstrando a eficácia do uso do G-CSF na mobilização de CT de medula óssea em modelo experimental de lesão isquêmica no miocárdio, causando a redução da mortalidade dos animais e levando ao remodelamento cardíaco. Esses resultados foram confirmados por Minatoguchi e colaboradores (2004) em um modelo de infarto em coelhos, no qual verificaram o aumento da fração de ejeção ventricular e diminuição do remodelamento após o tratamento com G-CSF. Em modelo de cardiopatia diabética em ratos com diabetes tipo 2, foi demonstrado que o tratamento com G-CSF causa uma melhora da disfunção diastólica nos animais, além de promoção da diminuição da fibrose perivascular e intersticial (LIM et al.,2011), o que corrobora o trabalho de Sugano e colaboradores (2005), que descrevem o G-CSF como uma citocina reguladora da síntese reparadora de colágeno em corações infartados.

O G-CSF foi inicialmente utilizado experimentalmente em modelos de doenças cardiovasculares por sua capacidade de recrutamento de CT, no entanto estudos mais recentes apontam a ação do G-CSF diretamente sobre cardiomiócitos promovendo o aumento da sua sobrevivência (MINATOGUCHI et al., 2004). Atualmente sabemos que tanto o G-CSF quanto o seu receptor são expressos em cardiomiócitos durante todo o período embrionário, sugerindo sua participação no desenvolvimento desse órgão. A adição de G-CSF a cultura de CT embrionárias ou a CT induzidas derivadas de cardiomiócitos não só aumentou a proliferação de cardiomiócitos como também aumentou a expressão do marcador cardíaco Nkx2.5, confirmando o papel do G-CSF na cardiogênese (SHIMOJI et al.,2010). Um estudo recente demonstrou, por exemplo, que o G-CSF é capaz de ativar diversas vias de sinalização intracelular, como a ativação de Akt e da via Jak2-STAT3, em cardiomiócitos, prevenindo dessa forma o remodelamento cardíaco associado com infarto do miocárdio (TAKANO et al.,2007).

Apesar do conhecimento da ação imunomoduladora do G-CSF, os mecanismos envolvidos na melhora da função cardíaca após a administração de G-CSF ainda não estão totalmente esclarecidos. Levando-se em consideração que a doença de Chagas é uma das principais causas de falência cardíaca na América Latina, e que existem poucos recursos terapêuticos para a forma crônica sintomática da doença, o uso terapêutico do G-CSF na cardiopatia chagásica se torna atraente não só por ser um tratamento não invasivo quando comparado ao transplante celular ou cardíaco, mas também por ser uma terapia inovadora em modelo de CChC.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Investigar a eficácia do tratamento com G-CSF recombinante, por três ciclos, na melhora da insuficiência cardíaca de etiologia chagásica e seus possíveis mecanismos de ação, em modelo experimental de camundongos cronicamente infectados por *Trypanosoma cruzi* da cepa Colombiana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a função cardiorespiratória dos animais chagásicos crônicos tratados ou não com G-CSF;
- Avaliar os efeitos do G-CSF na modulação da resposta inflamatória e da fibrose no coração de camundongos chagásicos crônicos;
- Avaliar os efeitos do tratamento com G-CSF no parasitismo na fase crônica da infecção por *T. cruzi*;
- Avaliar os efeitos do tratamento com G-CSF na resposta imune através da comparação da produção de citocinas e anticorpos entre os camundongos na fase crônica da infecção;
- Investigar a produção de moléculas de adesão e de moléculas pró-inflamatórias em corações dos camundongos infectados e tratados ou não com G-CSF;
- Investigar a ação do G-CSF sobre o recrutamento de células T regulatórias nos animais chagásicos crônicos;
- Avaliar a ação direta do G-CSF sobre o *T. cruzi* in vitro.

2. CAPÍTULO I

“Granulocyte Colony-Stimulating Factor treatment in Chronic Chagas Disease: Preservation and Improvement of cardiac structure and function”, publicado no periódico The FASEB Journal, no ano de 2009.

G-CSF treatment in chronic Chagas' disease: improvement of heart lesions and cardiopulmonary function

Garcia, S.^{1,2}, Vasconcelos, J.F.¹, Costa, C.R.¹, Lima, R.S.¹, Guimarães P¹, Nascimento, D.¹, Cortizo, L.¹, Klein, W.³, Cruz, C.M.¹, Ribeiro dos Santos, R.^{1,4} & Soares, M.B.P.^{1,4}

¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.

²Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

³Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

⁴Instituto de Terapia Celular Brasil

Running title: *G-CSF treatment in experimental Chagas' disease*

Abstract

Chagas' disease, one of the leading causes of heart failure in Latin American countries remains without an effective treatment other than cardiac transplantation. Here we investigated the effects of G-CSF therapy in cardiopulmonary function, myocarditis and heart fibrosis in an experimental model of chronic Chagas' disease. C57Bl/6 mice were infected with 10^3 trypomastigotes of Colombian strain *T cruzi* intraperitoneally and treated with human recombinant G-CSF (3 cycles of 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ for 5 consecutive days with 9 days intervals) or saline solution. A reduction of inflammatory cell number and of fibrosis area was observed in hearts of G-CSF-treated chagasic mice, compared to saline-treated chagasic mice. G-CSF treatment did not alter the parasite load, but caused an increase in the number of apoptotic inflammatory cells in the heart. The levels of SDF-1 in the heart of chagasic mice treated with saline, but not with G-CSF, were increased compared to normal mice. All chagasic mice had cardiac disturbances such as AV blockage, intraventricular conduction disturbances, and abnormal cardiac rhythm before treatment. In the group treated with G-CSF (n=6), 2 animals had improvement of cardiac conduction, 3 had no alterations and one became worse, from 1st degree AV blockage to AV dissociation. The distance and the exercise time were significantly higher in G-CSF-treated mice compared to chagasic controls. When submitted to exercise, the $\dot{V} \text{O}_2$ consumption, $\dot{V} \text{CO}_2$ production, and respiratory exchange ratio in G-CSF-treated mice were also significantly higher than saline-treated controls. In conclusion, G-CSF treatment reversed the structural abnormalities in chagasic hearts, correlating with the improvement in cardiopulmonary function.

Keywords: Chagas' disease; cardiomyopathy; G-CSF; ergometry, arrhythmias

Introduction

Chagas' disease, caused by *Trypanosoma cruzi* infection, is one of the main causes of death due heart failure in Latin American countries. About one fourth of *Trypanosoma cruzi*-infected individuals develop chronic chagasic cardiomyopathy (CChC), the most severe form of disease. The chemotherapeutic agent used in the treatment of chagasic patients is highly toxic and has limited efficacy, especially in the chronic phase of the disease. The CChC aggravated by severe heart failure has as unique definitive treatment available the heart transplantation.

Studies aiming to establish therapeutic alternatives to restore the cardiac function using stem cells from different sources or of the administration of growth factors have been developed. Bone marrow stem cells are capable of differentiate into cardiomyocytes and endothelial cells and may participate in the regeneration of cardiac lesions (). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) has been reported to increase the number of peripheral granulocytes (15) and to induce the mobilization of bone marrow stem cells from bone marrow to the periphery (17). This property, added to the potential regenerative capacity of bone marrow stem cells, are the basis to justify the efforts done in order to prove the efficacy of this therapeutic conduct and to elucidate mechanisms of action.

A number of reports have shown the beneficial effects of G-CSF in the treatment of heart lesions caused by ischemia (). The use of G-CSF in therapy is attractive because it is already used in clinical practice, has mild side effects and is a less invasive treatment than bone marrow aspiration and cell transplantation.

We have previously shown that therapy with bone marrow cells decreases heart inflammation and fibrosis in a mouse model of chronic chagasic cardiomyopathy (Soares et al, 2004). In the present study we investigated the effects of G-CSF on structural and functional alterations through cardiopulmonary function evaluation in the experimental model in order to propose new G-CSF-based therapies efficient to induce repair of electrical and mechanical function of the heart in patients with chronic chagasic cardiomyopathy.

Materials and methods

Animals

Two month-old male C57Bl6 mice, raised and maintained in the animal facilities at the Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ, were used in the experiments, and were provided with rodent diet and water *ad libitum*. All animals were sacrificed under anesthesia and handled according the NIH guidelines for ethical use of laboratory animals.

T. cruzi infection and treatment with G-CSF

Mice were infected by intraperitoneal injection of 1000 trypomastigote forms of Colombian strain *T. cruzi* (15). Trypomastigotes were obtained by in vitro infection of LCC-MK2 cell line. Parasitemia was evaluated at different time points after infection by counting the number of trypomastigotes in peripheral blood aliquots contained between a glass slide and a coverslip (5). Groups of chronic chagasic mice (6 months after infection) were treated with human recombinant G-CSF (Granulokine® 30, Hoffman la Roche, Switzerland) (200 µg/kg/day during 5 consecutive days with 3 cycles of administrations) or with 5% glucose saline solution in the same regimen.

Histopathological analysis

Hearts from G-CSF treated mice and untreated controls were removed and fixed in buffered 10% formalin. Sections of paraffin-embedded tissue were stained by standard hematoxylin/eosin and Sirius red staining for evaluation of inflammation and fibrosis, respectively, by optical microscopy. Images were digitalized using a color digital video camera (CoolSnap, Montreal, Canada) adapted to a BX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The images were analyzed using the Image Pro Program version 5.0 (Media Cybernetics, San Diego, CA, USA), to integrate the number of inflammatory cells counted by area. Ten fields were counted per heart from every mouse of each group.

Parasite quantification

Detection of parasite nests was done by immunofluorescence analysis. Five μm thick frozen heart sections were prepared in a cryostat in poly-l-lysine-coated slides and fixed with cold acetone. Sections were incubated with PBS 5% BSA for 30 min followed by overnight incubation with rat serum anti-*T. cruzi* (1:400). After washing with PBS, sections were incubated for one hour with FITC-conjugated rabbit anti-rat IgG 1:100 (Sigma, St Louis, MO, USA) adsorbed with normal mouse serum. Sections were washed 3 times, counterstained with Evans blue, and mounted with vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA). Images were digitalized using a color digital video camera (DP-70) adapted to an Olympus AX-70 microscope (Olympus). The images were analyzed using the Image Pro Program version 5.0 (Media Cybernetics), and the number of parasite foci was counted in ten fields per heart, 5 mice per group, and integrated by area.

SDF-1 assessment

SDF-1 levels were measured in total protein heart extracts. Briefly, heart proteins were extracted at 100 mg of tissue/ml of PBS to which 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20 and

protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KI aprotinin A/100 ml) were added. The samples were centrifuged for 10 min at 3000 g and the supernatant was frozen at -70° C for later quantification. SDF-1 levels were estimated using a commercially available Immunoassay ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's guidelines. Briefly, 96-well plates were blocked and incubated at room temperature for 1 h. Samples were added in duplicates and incubated overnight at 4° C. Biotinylated antibodies were added and plates were incubated for 2 h at room temperature. A half-hour incubation with streptavidin–horseradish peroxidase conjugate at a dilution of 1:200 was followed by detection using 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase substrate and read at 450 nm.

Apoptosis assay

Apoptosis in heart sections was evaluated by terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay, performed using in situ DeadEnd Colorimetric TUNEL System kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. First, the sections were fixed using 4 % formaldehyde, and endogenous peroxidase activity was quenched with 0.3% H₂O₂ in methanol. Then slides were incubated with reaction mixture with recombinant Terminal deoxynucleotidyl Transferase (rTdT) for 60 min at 37° C followed by DAB detection assay (Promega). Images were digitalized using a color digital video camera (DP-70) adapted to an Olympus AX-71 microscope, (Olympus). Quantitative analysis were performed using the Image Pro Program version 5.0 (Media Cybernetics) and expressed as the number of positive cells/mm². Results were expressed on the mean of 10 sections from 4 animals per group. The positive controls were nuclease treated slides.

ECG analysis

Electrocardiograms were performed using the Bio Amp device PowerLab System (PowerLab 2/20; ADInstruments, Castle Hill, Australia), recording the bipolar lead I. All animals were anesthetized by intraperitoneal injection of xilazine at 10 mg/kg body weight and ketamine at 100 mg/kg body weight. Electrocardiographic recordings were obtained after the induction of general anesthesia. All data were acquired to a computer for further analysis using Chart 5 for Windows software (Power Lab; ADInstruments). Wave durations (ms) were calculated automatically by the software after the cursors were placed. Measurements are average values determined from 14 consecutive ECG records. Records were bandpass filtered (1 to 100 Hz) to minimize environmental signal disturbances. The sampling rate was 1 kHz. The ECG analysis included the following measurements: heart rate; PR interval; P wave duration; QT interval; QTc; atrioventricular block; intraventricular block and other arrhythmias. The software used a derivate-based QRS detection algorithm to calculate heart rate by detecting the peak of R waves automatically. As in rodent ECGs the T waves are normally not separated from QRS complex (4), we measured the QT interval instead of measuring QRS complex duration. The QT interval was measured from the beginning of QRS up to the end of T wave. The definition of the end of T wave was the point where the signal returned to the isoelectric line (36). The QTc was calculated as the ratio of QT interval by square roots of RR interval.

Treadmill

A motor-driven treadmill chamber (LE 8700, Panlab S.I., Barcelona, Spain) was used to exercise the animals. The speed of the treadmill and the intensity in milliamps of the shock were controlled by a potentiometer (LE 8700 treadmill control, Panlab). Room air was pumped into the chamber at a controlled flow rate (700 ml/min) by a chamber air supplier

(OXYLET LE 400, Panlab). Outflow was directed to an oxygen and carbon dioxide analyzer (OXYLET 00, Panlab), to measure consumption of oxygen ($\dot{V} O_2$), production of carbon dioxide ($\dot{V} CO_2$), and the respiratory exchange ratio (RER). The mean room temperature was maintained at $21 \pm 1^\circ C$. Mice were placed individually in the treadmill chamber for an adaptation period of 40 minutes before running at five different velocities (7.2, 14.4, 21.6, 28.8 and 36.0 m/min), starting with the lowest speed and increasing velocity after 10 min of exercise at a given speed. Velocities were increased until the animal could no longer sustain a given speed and remained for more than 10 seconds on an electrified stainless steel grid at the end of the treadmill, which provided an electrical stimulus to keep the mice running. After reaching exhaustion, animals were left undisturbed in the treadmill chamber for 30 minutes allowing recovery. $\dot{V} O_2$ and $\dot{V} CO_2$ were determined using the program Metabolism for 2 channels Powerlab (ADInstruments) analyzing a period of 5 min just before animals were put to run (resting), the last five minutes recorded at each speed or, when the animal reached exhaustion, a two minute period immediately before exhaustion. During recovery, $\dot{V} O_2$ and $\dot{V} CO_2$ were determined during a three-minute period following immediately after cessation of exercise (recovery 1) and at the end of the 30-minute recovery period (recovery 2). Subsequently, RER was calculated. Additionally, total running distance and running time were recorded. To determine peak oxygen consumption we measured the greatest value in oxygen consumption shown by each mouse during exercise on the treadmill.

Statistical analyses

All continuous variables are presented as means \pm standard error. Morphometric and cytokine levels were analyzed using one way ANOVA, followed by Newman-Keuls multiple comparison test. Cardiopulmonary parameters were analyzed using Student's *t*-

test and Mann Whitney test with Prism Software version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Treadmill data were analyzed applying a Repeated Measures one way ANOVA, followed by an all-pairwise multiple comparison procedure (Student-Newman-Keuls Method) using Prism GraphPad 3.0. All differences were considered significant if P was equal to or less than 0.05.

Results

Decreased myocarditis and fibrosis after G-CSF treatment

Histopathological analysis of heart sections were carried out in order to determine the effects of G-CSF treatment in inflammation and fibrosis. A marked decrease in the number of inflammatory cells was observed two months after G-CSF treatment, when compared with those of saline-treated chagasic mice (Figures 1A and B). Morphometric analysis showed a significant reduction in the number of inflammatory cells after G-CSF treatment (Figure 2A). In addition, hearts of BMC-treated mice had a reduced area of fibrosis at that time (Figures 1C and D). G-CSF treated mice had a reduction in the percentage of fibrosis compared to saline-treated mice (Figure 2B). The number of inflammatory cells undergoing apoptosis was about 7-fold higher in hearts of G-CSF-treated mice compared to those of saline-treated mice (Figure 2C; $P < 0.0001$). The levels of SDF-1 (CXCL2) in hearts of saline-treated, but not of G-CSF-treated mice, are significantly higher than those of normal mice (Figure 2D). Importantly, hearts from both saline- and G-CSF-treated mice had similar numbers of parasite foci 2 months after therapy (2.4 ± 0.4 and 2.0 ± 0.6 parasite foci/mm², respectively; $P > 0.05$).

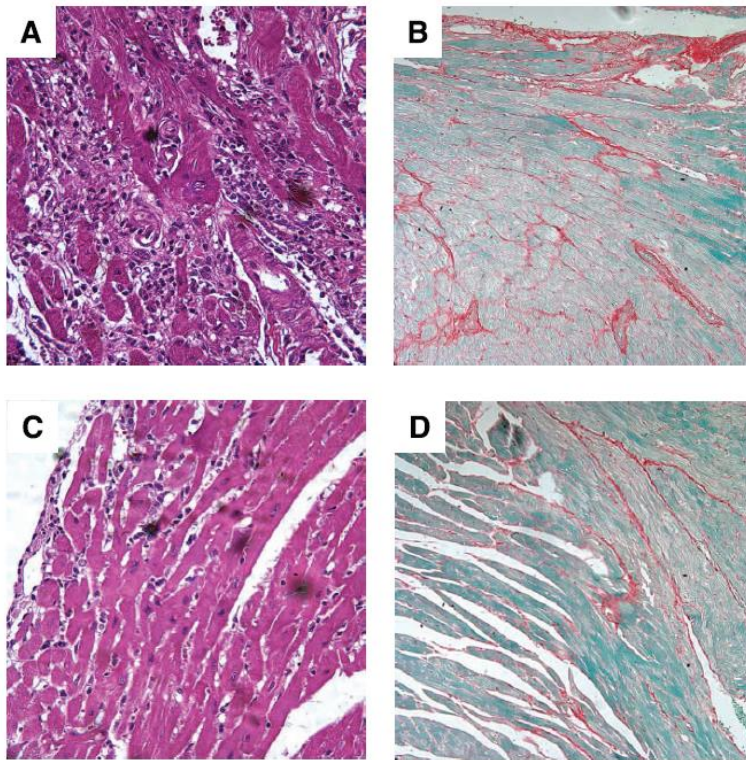


Figure 1. Histopathological analysis in heart sections of *T. cruzi*-infected mice. Heart sections of saline-treated (A, C) or G-CSF-treated (B, D) *T. cruzi*-infected mice were analyzed 2 mo after therapy. Staining: H&E (A, B, $\times 400$); Sirius red (C, D, $\times 200$).

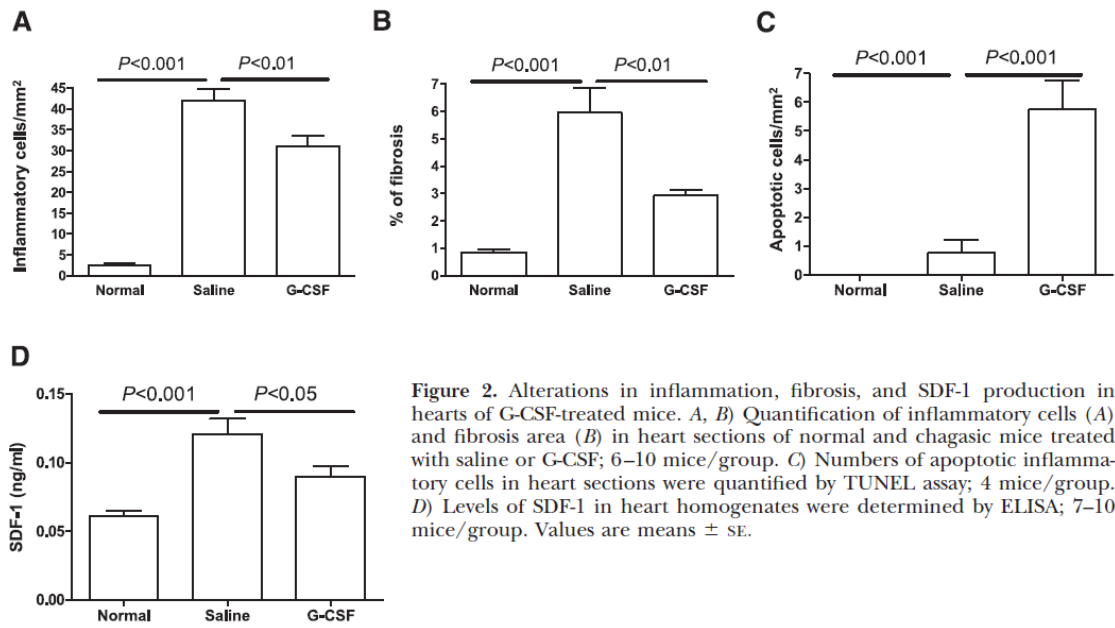


Figure 2. Alterations in inflammation, fibrosis, and SDF-1 production in hearts of G-CSF-treated mice. *A, B*) Quantification of inflammatory cells (*A*) and fibrosis area (*B*) in heart sections of normal and chagasic mice treated with saline or G-CSF; 6–10 mice/group. *C*) Numbers of apoptotic inflammatory cells in heart sections were quantified by TUNEL assay; 4 mice/group. *D*) Levels of SDF-1 in heart homogenates were determined by ELISA; 7–10 mice/group. Values are means \pm SE.

G-CSF treatment ameliorates the cardiac electrogenesis in chronic chagasic mice

To investigate whether G-CSF treatment in the chronic phase of infection ameliorates the cardiac function, ECG analyses were performed before the infection, 6 months after infection and 2 months after the treatment. All infected mice had significant alterations in ECG records such as AV blockage, intraventricular conduction disturbances and abnormal cardiac rhythm 6 months after infection, compared to normal mice (Table 1). In the group of chagasic mice treated with saline (n=7), none had improvement of cardiac function and 5 became worse 2 months after therapy (Table 1). In this group all animals showed severe cardiac conduction disturbances, such as intraventricular conduction disturbances and atrium-ventricular blocks (Table 1). In contrast, in the group treated with G-CSF (n=6), 2 animals had improvement of cardiac conduction (Figure 3), 3 had no alterations becoming stable and one became worse, evolving from 1st degree AV blockage to AV dissociation (Table 1).

Table 1 – Cardiac conduction disturbances in experimental groups before and 2 months after treatment with G-CSF

Cardiac conduction disturbances	Saline (n= 7)		G-CSF (n= 6)	
	Before treatment	2 mo after treatment	Before treatment	2 mo after treatment
1st degree AVB	5	0	2	2
IVCD	0	0	1	0
AVD	2	7	3	2
No disturbances	0	0	0	2

AVB, atrium-ventricular block; IVCD, intraventricular conduction disturbance; AVD, atrium-ventricular dissociation.

Improvement of exercise capacity in G-CSF-treated chagasic mice

All animals in the G-CSF-treated group (n=7) and in the normal control group (n=10) were able to exercise on the treadmill. The non-infected mice tested were able to sustain locomotion at all belt speeds tested (7.2, 14.4, 21.6 and 28.8 m/min) whereas only two out of seven of the untreated infected mice were able to keep up with a belt speed of up to 14.4 m/min. All of the G-CSF-treated infected mice sustained locomotion at a speed of 14.4 m/min but only three out of seven animals were able to perform at 21.6 m/min. These differences resulted in significant greater running times and distances covered by G-CSF-treated mice when compared to saline-treated chagasic mice, although G-CSF-treated mice still performed less than normal mice (Figure 4).

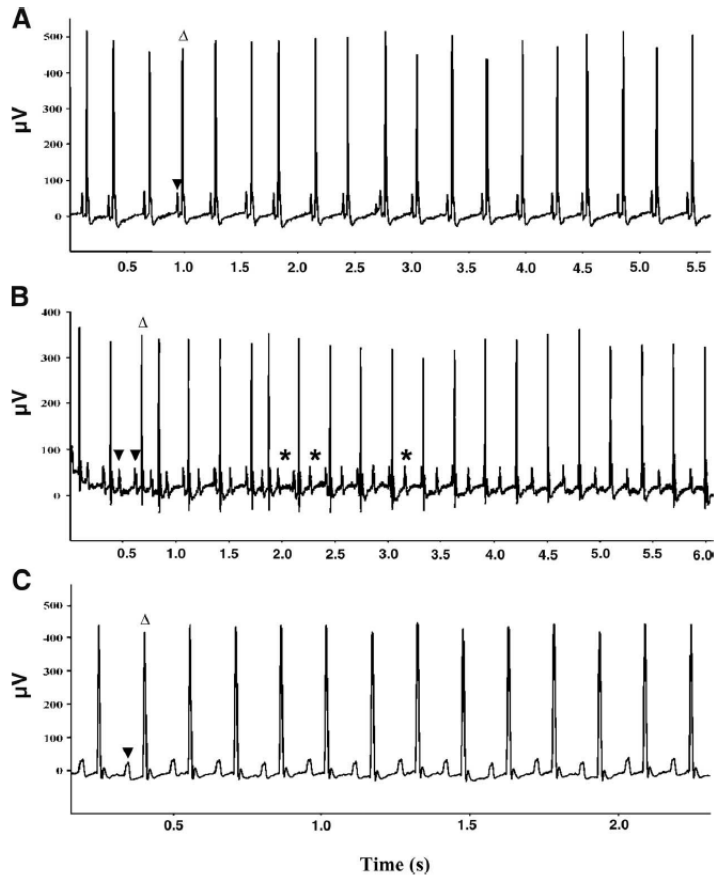


Figure 4. Reversion of cardiac disturbance after G-CSF treatment. ECG of a mouse before infection (A); 6 mo after infection, before G-CSF treatment (B); and 2 mo after G-CSF treatment (C). ▼, P wave; Δ, QRS complex; *, A-V dissociation.

Under resting conditions, the respiratory exchange ratio was significantly different between each group, whereas $\dot{V} O_2$ and $\dot{V} CO_2$ showed no differences (Figure 5). During exercise stages 1 and 2, $\dot{V} CO_2$ was significantly greater in the normal mice compared with G-CSF-treated mice and respiratory exchange ratio was significantly greater in normal mice at exercise stage 2 when compared with the G-CSF group. Shortly after exercise, $\dot{V} O_2$ and $\dot{V} CO_2$ were significantly greater in normal mice when compared with G-CSF-treated mice and $\dot{V} CO_2$ remained significantly greater during recovery when compared with both other groups. Within the normal mice, $\dot{V} O_2$, $\dot{V} CO_2$ and RER rose significantly during exercise above resting values, reaching its greatest $\dot{V} O_2$ shortly after cessation of exercise and decreasing respiratory variables during the recovery phase. The G-CSF-treated mice showed no significant elevation of $\dot{V} O_2$ and $\dot{V} CO_2$ during exercise when compared with resting values, but $\dot{V} O_2$ and $\dot{V} CO_2$ shortly after exercise were significantly greater than the values measured during the other stages. Furthermore, peak oxygen consumption of normal mice was significantly greater than that of chagasic mice treated with G-CSF (Fig. 6).

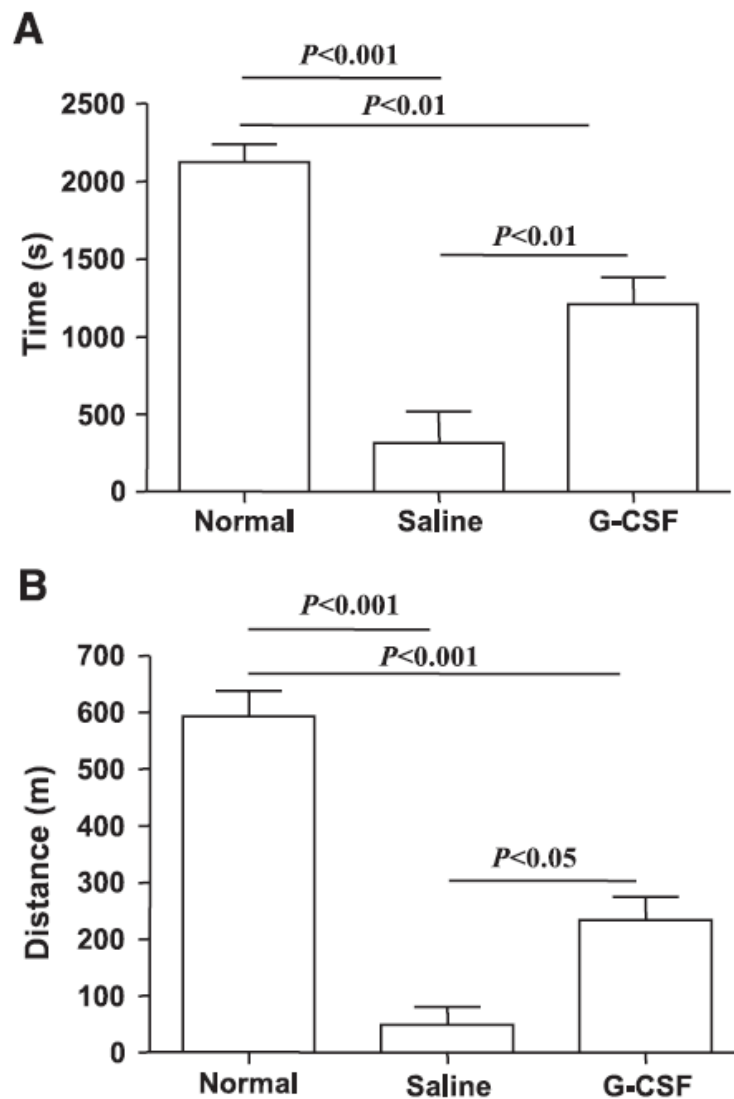


Figure 5. G-CSF treatment improves the capacity of infected mice to perform exercise. Time (A) and distance run (B) on a motorized treadmill by normal (noninfected) mice ($n=10$) and chronic chagasic mice treated with saline ($n=2$) or with G-CSF ($n=7$). Data are means \pm SE. Note that running time and distance of saline-treated mice are highly influenced by 2 of the 6 animals tested that were able to exercise on the treadmill, whereas the other 4 saline-treated animals were not able to run on the treadmill.

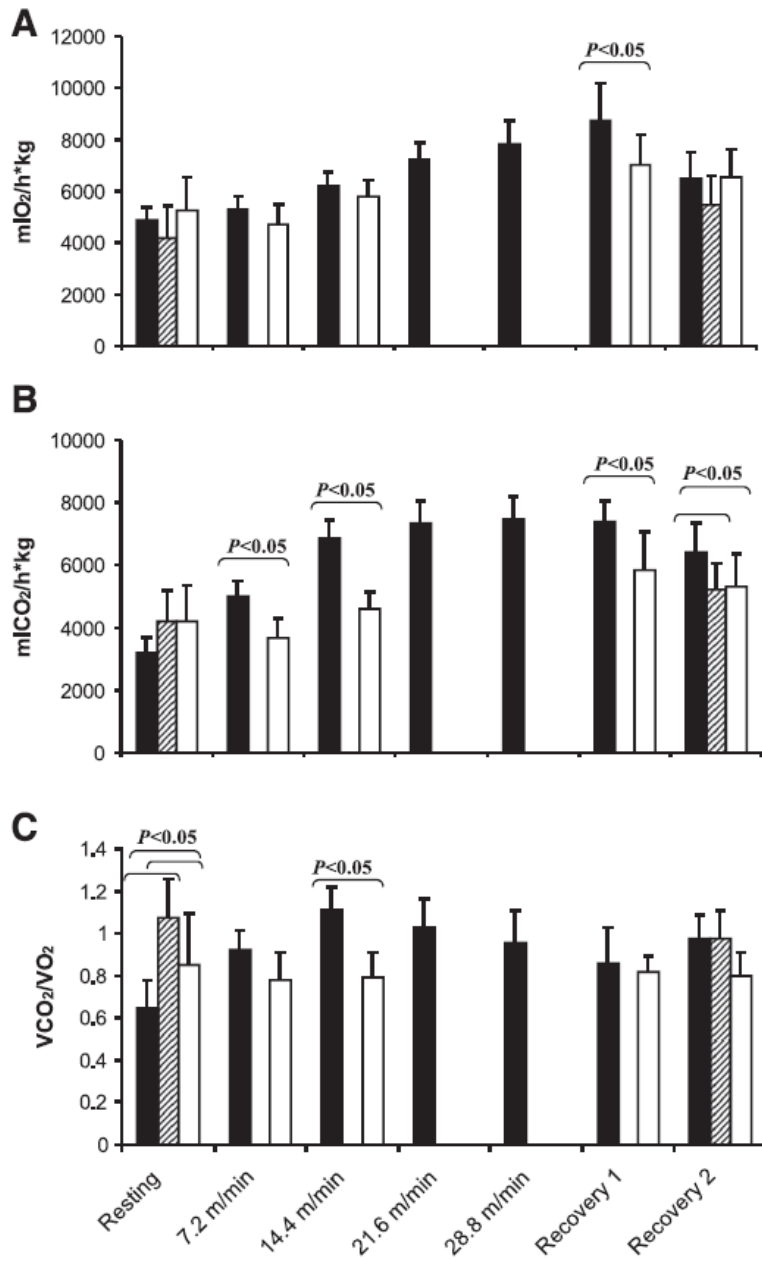


Figure 6. Cardiopulmonary function amelioration during physical effort after G-CSF administration. Oxygen consumption (A), carbon dioxide release (B), and respiratory exchange ratio (C) in normal mice (solid columns), saline-treated chagasic mice (dashed columns), and G-CSF-treated chagasic mice (open columns) during resting conditions, exercising at 4 different velocities (7.2, 14.4, 21.6, and 28.8 m/min) on a motorized treadmill, immediately (recovery 1) and 30 min after exercise (recovery 2). Data are means \pm SD; 6–10 mice/group. Note that only 2 of 6 saline-treated infected animals were able to run at a velocity of 14.4 m/min; therefore, no data are given for saline-treated infected mice during exercise.

Discussion

Significant progress in the field of cardiac therapy is achieved using models of myocardial infarction to discover efficient and definitive therapies for cardio-pathologies. G-CSF is a cytokine known to improve cardiac function and recovery in models of ischemic disease (). In this study we demonstrated that repeated administration of G-CSF is capable of inducing beneficial effects on cardiac structure, such as reduction of inflammation and fibrosis that were well correlated with improvements in cardiac function in our experimental model of chronic chagasic cardiomyopathy. This is a model that closely resembles the human disease, with myocardial and functional alterations characteristic of chronic chagasic cardiomyopathy (Soares et al, 2001; Rocha et al, 2006).

One of the main features of chronic chagasic cardiomyopathy is the presence of prominent inflammation with participation of an autoimmune component (Pontes de Carvalho et al, 2002; Soares et al, 2001; Leon et al, 2001), that causes destruction of myofibers and fibrosis deposition. In a previous report we have recently shown that autologous BMC transplant modulates the myocarditis in our model of Chagas' disease (Soares et al, 2004). This effect was associated with apoptosis of inflammatory cells. In the current study we also found that the decrease in inflammation after G-CSF therapy correlated with an increase in apoptosis of inflammatory cells. Thus, the benefits of G-CSF therapy may result in part from regulation of pathological immune responses. In fact, recent reports have demonstrated that G-CSF inhibit and stimulate apoptosis of T cells (Rutella et al, 2001, 2002).

We found in this work that SDF-1 levels in the heart are increased by chronic *T. cruzi* infection. The modulation of heart inflammation by G-CSF therapy also correlated with a reduction in SDF-1 in the hearts of chronic chagasic mice. This is a chemokine known to promote the recruitment of inflammatory cells, including T cells. In addition, SDF-1 recruits stem cells which express its receptor, CXCR4 (Vandeverde et al, 2005), and may play a role in other inflammatory processes in the heart (Wojakowski et al, 2004; Myeno et al, 2006). Thus, since G-CSF is a factor that mobilizes stem/precursor cells to the periphery, it is possible that these cells migrate to the inflamed myocardium and contribute to tissue regeneration, since it has been shown before that mobilized bone marrow cells repair the damaged myocardium (Fukuhara et al, 2004). In fact, we previously found that transplanted bone marrow cells migrate to and differentiate into cardiomyocytes (Soares et al, 2004).

Sugano et al (2005) described, in an experimental model of myocardial infarction, an accelerated healing process, which was attributed to increased reparative collagen synthesis in affected areas after G-CSF administration. A reduction in fibrosis was observed, however, with a long term treatment using low doses of G-CSF after myocardial infarct (Okada et al, 2008). In our study we also found a significant reduction in heart fibrosis after G-CSF treatment.

Another feature of chronic Chagas' disease is the scarce parasitism found in this phase of infection. Several studies have demonstrated that *T. cruzi* parasites or antigens can be found, although rarely, in individuals with chronic infection (Jones et al. 1993, Palomino et al. 2000). Although the inflammatory response was modulated after G-CSF therapy, the residual parasite load in our experimental model was not affected by this treatment.

It has been proposed that the main effect of G-CSF after severe cardiac injury is to induce the proliferation of cardiac stem cells rather than bone marrow stem cells migration and proliferation. Kanellakis et al (2006) demonstrated, in a model of acute myocardial infarction, that G-CSF/SCF therapy improves cardiac function when administered after myocardial infarct, increasing the number of blood vessels and cells of the cardiomyogenic lineage. However, differently from previous studies they demonstrated that these cells were of myocardial rather than bone marrow origin. They also provided evidence that the effects were due to G-CSF alone since the addition of SCF to G-CSF provided little additional benefit at the functional level. Brunner et al (2008) demonstrated that treatment with G-CSF after myocardial infarct reduces the migratory capacity of bone marrow cells into ischemic tissue, but increases the number of resident cardiac cells.

Although we did not aim to investigate the intracellular pathways activated by G-CSF, the mechanism proposed by Harada et al (2005) could in part be responsible for the better performance of G-CSF treated mice during the exercise test observed in our work. Harada et al (2005) investigated the molecular mechanism by which G-CSF prevented the impairment of heart function after experimental myocardium infarction and proposed that activation of JAK/STAT pathway due to the interaction of G-CSF with its receptor in the sarcolemma of cardiomyocytes was more relevant and was activated before the mobilization and cardiac homing of bone marrow stem cells. The resulting beneficial effects such as angiogenesis and expression of anti-apoptotic proteins could influence the process of cardiac remodeling leading to the improvement of myocardium performance as demonstrated by the reduction of left ventricular end diastolic dimension and of end-diastolic pressure in our echocardiographic study. To maintain physical exercise capacities

it is necessary to preserve diastolic as well as systolic function. To achieve this goal in cardio-myopathologies it is not only necessary to restore heart tissue but also to avoid structural loss of cardiac myocytes by apoptosis as well as to guarantee the appropriated perfusion of cardiac tissues by newly formed coronary vessels.

In our study we showed that G-CSF administration can avoid the aggravation of cardiac disturbances associated with chronic Chagas disease and, more important, seems to reverse some of the severe pathologies associated with chronic chagasic cardiomyopathy. On the other hand, the untreated group became worst and aggravated the cardiac abnormalities. These results were in agreement with other pre-clinical studies that investigated the anti-arrhythmic effects of G-CSF (Kuhlmann et al, 2006; Kuwabara et al, 2007). These authors showed an increase in protein expression levels of b-catenin and Cx43. The former being necessary to fix many proteins in the cell membrane including the proteins related to gap junction formation. Cx43 is responsible for cell–cell communication, and thereby allows the appropriated conduction of cardiac impulses through the whole heart suppressing arrhythmias. Kuhlmann et al (2006) proposed that the enhanced expression of the G-CSF receptor demonstrated in cardiomyocytes and other cell types of the infarcted myocardium indicates a sensitization of the heart to direct influences of this cytokine.

In our study we were able to observe an increase in oxygen consumption in G-CSF treated chagasic mice during exercise, showing values of oxygen consumption similar to the levels reached by the uninfected control group, which indicates adequate adjustments of cardiac output during light exercise regarding oxygen transport. Values of peak oxygen consumption during exercise, however, were significantly lower in G-CSF mice compared with normal mice indicating that recovery is not complete (Fig. 6). Carbon

dioxide release, on the other hand, showed a significantly different pattern. Whereas $\dot{V} \text{CO}_2$ increased in normal mice at the lower velocities, reaching a plateau in the subsequent exercise speeds and the first recovery period, carbon dioxide release in G-CSF treated chagasic mice seemed to be significantly impaired. The reasons for such a discrepancy, animals matching their oxygen consumption demands but not being able to appropriately release CO_2 during light exercise remain unknown. Respiratory exchange ratio was significantly greater in untreated chagasic mice compared with both other groups. This could be due to a reduced capacity of chagasic mice to carry oxygen to the tissues, resulting in elevated anaerobic metabolism and increased release of carbon dioxide.

Li et al (2006) showed that administration of G-CSF in an experimental model of chronic heart failure improved the myocardium contractility by avoiding the systolic and diastolic dysfunction through the changed in the geometry of the infarcted heart to short and thick, induced hypertrophy among surviving cardiomyocytes, and reduced myocardial fibrosis. These effects, as shown in other studies, could be explained by a direct effect of G-CSF on cardiomyocytes that could lead to the activation of an intracellular signal cascade and thereby exacerbating some pathologies, since the expression of G-CSF receptor was confirmed in failing hearts and was up-regulated by G-CSF treatment. Our results are in agreement with Li et al (2006) as G-CSF administration caused a reduction in functional impairment and partial recovery of heart structure.

Chronic heart failure remains a leading cause of mortality due to the absence of an efficient therapy that avoids structural and electrical cardiac remodeling. The only option for patients affected by heart failure such as chagasic cardiomyopathy remains heart transplantation. Besides limitations of available donated organs, in the specific case of

Chagas' disease the use of immunosuppressors following heart transplantation can affect the latent parasitism. Based on the beneficial effects of G-CSF shown in the present study, such as reversion of cardiac disturbances, improvement of cardiopulmonary capacity during exercise and reduction of inflammation and fibrosis, we conclude that this may be a promising therapy for the treatment of patients with heart failure due to Chagas' disease. An ongoing phase I/II clinical trial of G-CSF therapy with multiple administrations in chagasic patients (Soares et al, 2007) may indicate the benefits of this therapy in humans.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian Ministry of Science and Technology, CNPq, FINEP, FIOCRUZ and FAPESB.

References

- Adesse, D., Garzoni, L. R., Huang, H., Tanowitz, H. B., de Nazareth Meirelles, M., and Spray, D. C. (2008) Trypanosoma cruzi induces changes in cardiac connexin43 expression. *Microbes Infect.* 10, 21–28
- Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S., and Zeiher, A. M. (2002) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circulation* 106, 3009–3017
- Brener, Z. (1973) Biology of Trypanosoma cruzi. *Ann. Rev. Microbiol.* 27, 347–382
- Brunner, S., Huber, B. C., Fischer, R., Groebner, M., Hacker, M., David, R., Zaruba, M. M., Vallaster, M., Rischpler, C., Wilke, A., Gerbitz, A., and Franz, W. M. (2008) G-CSF treatment after myocardial infarction: Impact on bone marrow derived vs cardiac progenitor cells. *Exp. Hematol.* 36, 695–702
- Clark, S. C., Kamen, R. (1987) The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236, 1229–1237
- Deindl, E., Zaruba, M. M., Brunner, S., Huber, B., Mehl, U., Assmann, G., Hofer, I. E., Mueller-Hoecker, J., and Franz, W. M. (2006) G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J.* 20, 27–36
- Federici, E. E., Abelmann, W. B., and Neva, F. A. (1964) Chronic and progressive myocarditis in CH3 mice infected with Trypanosoma cruzi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13, 272–280
- Fujita, J., Mori, M., Kawada, H., Ieda, Y., Tsuma, M., Matsuzaki, Y., Kawaguchi, H., Yagi, T., Yuasa, S., Endo, J., Hotta, T., Ogawa, S., Okano, H., Yozu, R., Ando, K. and Fukuda, K. (2007) Administration of granulocyte colony-stimulating factor after myocardial infarction enhances the recruitment of hematopoietic stem cell-derived myofibroblasts and contributes to cardiac repair. *Stem Cells* 25, 2750–2759
- Fukuhara, S., Tomita, S., Nakatani, T., Ohtsu, Y., Ishida, M., Yutani, C., and Kitamura, S. (2004) G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. *Cell Transplant.* 13, 741–748
- Harada, M., Qin, Y., Takano, H., Minamino, T., Zou, Y., Toko, H., Ohtsuka, M., Matsuura, K., Sano, M., Nishi, J., Iwanaga, K., Akazawa, H., Kunieda, T., Zhu, W., Hasegawa, H., Kunisada, K., Nagai, T., Nakaya, H., Yamauchi-Takahara, K., and Komuro,

- I. (2005) G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat. Med.* 11, 305–311
- Iwanaga, K., Takano, H., Ohtsuka, M., Hasegawa, H., Zou, Y., Qin, Y., Odaka, K., Hiroshima, K., Tadokoro, H., and Komuro, I. (2004) Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 1353–1359
- Jones, E. M., Colley, D. G., Tostes, S., Lopes, E. R., Vnencak-Jones, C. L., and McCurley, T. L. (1993) Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 348–357
- Kanellakis, P., Slater, N. J., Du, X. J., Bobik, A., and Curtis, D. J. (2006) Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve endogenous repair after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 70, 117–125
- Kuhlmann, M. T., Kirchhof, P., Klocke, R., Hasib, L., Stypmann, J., Fabritz, L., Stelljes, M., Tian, W., Zwiener, M., Mueller, M., Kienast, J., Breithardt, G., and Nikol, S. (2006) G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin 43 expression and arteriogenesis. *J. Exp. Med.* 203, 87–97
- Kuwabara, M., Kakinuma, Y., Katare, R. G., Ando, M., Yamasaki, F., Doi, Y., and Sato, T. (2007) Granulocyte colony-stimulating factor activates Wnt signal to sustain gap junction function through recruitment of β -catenin and cadherin. *FEBS Lett.* 581, 4821–4830
- Laflamme, M. A., Myerson, D., Saffitz, J. E., and Murry, C. E. (2002) Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ. Res.* 90, 634–640
- Leon, J. S., Godsel, L. M., Wang, K., and Engman, D. M. (2001) Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. *Infect. Immun.* 69, 5643–5649
- Li, Y., Takemura, G., Okada, H., Miyata, S., Esaki, M., Maruyama, R., Kanamori, H., Li, L., Ogino, A., Misao, Y., Khai, N. C., Mikami, A., Minatoguchi, S., Fujiwara, T., and Fujiwara, H. (2006) Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. *Lab. Invest.* 86, 32–44
- Mieno, S., Ramlawi, B., Boodhwani, M., Clements, R. T., Minamimura, K., Maki, T., Xu, S. H., Bianchi, C., Li, J., and Sellke, F. W. (2006) Role of stromal-derived factor-1 in the induction of circulating CD34 CXCR4 progenitor cells after cardiac surgery. *Circulation* 114, I186–I192
- Muller, P., Pfeiffer, P., Koglin, J., Schafers, H. J., Seeland, U., Janzen, I., Urbschat, S., and

Bohm.M. (2002) Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation* 106, 31–35

Okada, H., Takemura, G., Li, Y., Ohno, T., Li, L., Maruyama, R., Esaki, M., Miyata, S., Kanamori, H., Ogino, A., Nakagawa, M., Minatoguchi, S., Fujiwara, T., and Fujiwara, H. (2008) Effect of a long-term treatment with a low-dose granulocyte colony stimulating factor on post-infarction process in the heart. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1272–1283

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, S., F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10344–10349

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701–705

Palomino, S. A., Aiello, V. D., and Higuchi, M. L. (2000) Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 571–579

Perin, E. C., Dohmann, H. F. R., Borojevic, Silva, R. S. A., Sousa, A. L. S., Mesquita, C. T., Rossi, M. I. D., Carvalho, A. C., Dutra, H. S., Dohmann, H. J. F., Silva, G. V., Belem, L., Vivacqua, R., Rangel, F. O. D., Esporcatte, R., Geng, Y. J., Vaughn, W. K., Assad, J. A. R., Mesquita, E. T., and Willerson, J. T. (2003) Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 107, 2294–2302

Pontes-de-Carvalho, L., Santana, C. C., Soares, M. B., Oliveira, G. G., Cunha-Neto, E., and Ribeiro-dos-Santos, R. (2002) Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. *J. Autoimmun.* 18, 131–138

Rocha, N. N., Garcia, S., Gimenez, L. E., Hernandez, C. C., Senra, J. F., Lima, R. S., Cyrino, F., Bouskela, E., Soares, M. B., Ribeiro-dos-Santos, R., and Campos de Carvalho A. C. (2006) Characterization of cardiopulmonary function and cardiac muscarinic and adrenergic receptor density adaptation in C57BL/6 mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology* 133, 729–737

Rutella, S., Pierelli, L., and Rumi, C. (2001) T-cell apoptosis induced by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is associated with retinoblastoma protein phosphorylation and reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Exp. Hematol.* 29, 401–415

Rutella, S., Pierelli, L., Bonanno, G., Sica, S., Ameglio, F., Capoluongo, E., Mariotti, A., Scambia, G., d'Onofrio, G., and Leone, G. (2002) Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells. *Blood* 100, 2562–2571

Soares, M. B., Garcia, S., Campos de Carvalho, A. C., and Ribeiro-dos-Santos, R. (2007) Cellular therapy in Chagas' disease: potential applications in patients with chronic cardiomyopathy. *Regen. Med.* 2, 257–264

Soares, M. B., Lima, R. S., Rocha, L. L., Takyia, C. M., Pontes-de-Carvalho, L., Campos de Carvalho, A. C., and Ribeiro-dos-Santos, R. (2004) Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduced myocarditis in chronic chagasic mice. *Am. J. Pathol.* 164, 441–447

Soares, M. B., Pontes-de-Carvalho, L., and Ribeiro-dos-Santos, R. (2001) The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73, 547–559

Soares, M. B., Silva-Mota, K. N., Lima, R. S., Bellintani, M. C., Pontes-de-Carvalho, L., and Ribeiro-dos-Santos, R. (2001) Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am. J. Pathol.* 159, 703–709

Sugano, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Maekawa, Y., Kohno, T., Mahara, K., Naito, K., and Ogawa, S. (2005) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 65, 446 – 456

Tanaka, J., Miyake, T., Shimizu, T., Wakayama, T., Tsumori, M., Koshimura, K., Murakami, Y., and Kato, Y. (2002) Effect of continuous subcutaneous administration of a low dose of G-CSF on stem cell mobilization in healthy donors: a feasibility study. *Int. J. Hematol.* 75, 489 – 492

Vandervelde, S., van Luyn, M. J., Tio, R. A., and Harmsen, M. C. (2005) Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 363–376

Wojakowski, W., Tendera, M., Michałowska, A., Majka, M., Kucia, M., Maslankiewicz, K., Wyderka, R., Ochała, A., and Ratajczak, M. Z. (2004) Mobilization of CD34/CXCR4, CD34/CD117, c-met stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 110, 3213–3220

3 CAPÍTULO II

“Modulation of myocarditis after therapy with G-CSF in a mouse model of chronic Chagas disease is associated with an increase in regulatory T cells”, em fase de submissão.

Modulation of myocarditis after therapy with G-CSF in a mouse model of chronic Chagas disease is associated with an increase in regulatory T cells

Juliana Fraga Vasconcelos,^{1,2} Bruno Solano de Freitas Souza,^{1,2} Thayse Fernanda da Silva Lins,¹ Letícia Maria da Silva Garcia,² Carla Martins Kaneto,² Geraldo Pedral Sampaio,² Adriano Alcântara,² Cássio Santana Meira,¹ Simone Garcia Macambira,^{1,2} Ricardo Ribeiro-dos-Santos,² and Milena Botelho Pereira Soares^{1,2}

¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil;

²Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brazil.

Running title: **Immunomodulatory effects of G-CSF in Chagas disease**

Corresponding author: Milena B. P. Soares, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA, Brazil. CEP: 40296-710. Phone: (55) (71) 3176-2260; Fax: (55) (71) 3176-2272

E-mail address: milena@bahia.fiocruz.br

Abstract

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* infection, is a leading cause of heart failure in Latin American countries. In a previous study we showed beneficial effects of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) administration in the heart function of mice with chronic *T. cruzi* infection, we investigated here the mechanisms by which this cytokine exerts its beneficial effects. Mice chronically infected with *T. cruzi* were treated with human recombinant G-CSF (3 courses of 200 µg/kg/day for 5 days). A reduction of inflammation and fibrosis was observed in the hearts of G-CSF-treated mice, compared to vehicle-treated mice, which correlated with decreased syndecan 4, ICAM 1 and galectin 3 expressions. A marked reduction of IFN γ and TNF α , as well as an increase of IL-10 and TGF β , was found after G-CSF administration. Since the therapy did not induce a Th1- to Th2-immune response deviation, we investigated the role of regulatory T cells. A significant increase in CD4⁺FoxP3⁺ cells was found in hearts of G-CSF-treated mice. In addition, a reduction of parasitism was observed after G-CSF treatment. Our results indicate a role of Treg in the immunosuppression induced by G-CSF treatment and reinforces its potential use as treatment for Chagas disease patients.

Introduction

Chagas disease, caused by infection with *Trypanosoma cruzi*, is considered a neglected tropical disease endemic of Latin American countries, where it mainly affects the poorest populations.^{1,2} Although recent data indicate a reduction in the number of infected people as a result of vector transmission control, it is estimated the presence of 10 million infected people and 25 million people at risk of contracting the disease.^{3,4} About 70% of infected individuals remain asymptomatic, whereas 30% will develop the chronic symptomatic form of Chagas disease. Chronic chagasic cardiomyopathy (CChC), the most common symptomatic form of the disease, is one of the leading causes of heart failure. The only available treatment is heart transplantation, a high cost procedure, limited by organ donation, and with severe complication in Chagas disease patients due to reactivation of infection following immunosuppressant administration.⁵

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is a pleiotropic cytokine which stimulates the production of neutrophils and the release of bone marrow stem cells into the peripheral circulation. It has been in clinical use for nearly two decades, mainly as an adjunctive medication to chemotherapy or to mobilize stem cells for bone marrow transplantation.⁶ In addition to neutrophils and their precursors, monocytes are direct target cells of G-CSF action.^{7,8} The administration of G-CSF in models of cardiac ischemic diseases has also shown the potential use of this cytokine in regenerative medicine.⁹⁻¹¹

Evidence is now accumulating that G-CSF has also immunomodulatory effects on adaptive immune responses by several mechanisms, including activation of T regulatory (Treg) cells.¹² Treg cells express the regulatory lineage factor Foxp3, comprise 5 to 10% of peripheral CD4⁺ T cells and are known as natural regulatory T cells.¹³ CD4⁺ T cells from G-CSF-mobilized stem cell donors are able to suppress allo-proliferative responses of autologous T cells in a cell contact-independent manner, by acquiring a Treg like cytokine

profile.¹⁴ G-CSF drives the in vitro differentiation of human dendritic cells that express tolerogenic markers involved in Treg cell induction.¹⁵

We have previously demonstrated that administration of G-CSF in mice with chronic heart lesions caused by *T. cruzi* infection improved the heart structure and function.¹⁶ Here we investigated the immunomodulatory effects of G-CSF in a mouse model of chronic Chagas disease, by investigating the modulation of key inflammatory mediators and the participation of T regulatory cells.

Materials and methods

Animals

Four week-old male C57BL/6 mice were used for *T. cruzi* infection and as normal controls. All animals were raised and maintained at the Gonçalo Moniz Research Center/FIOCRUZ in rooms with controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$) and continuous air flow. Animals were housed in a 12 h light/12 h dark cycle (6 am - 6 pm) and provided with rodent diet and water *ad libitum*. Animals were handled according to the NIH guidelines for animal experimentation. All procedures described had prior approval from the local animal ethics committee under number L-002/11 (Fiocruz, Bahia).

***Trypanosoma cruzi* infection and G-CSF administration**

Trypomastigotes of the myotropic Colombian *T. cruzi* strain¹⁷ were obtained from culture supernatants of infected LLC-MK2 cells. Infection of C57BL/6 mice was performed by intraperitoneal injection of 100 *T. cruzi* trypomastigotes in saline. Parasitemia of infected mice was evaluated at various times after infection by counting the number of trypomastigotes in peripheral blood aliquots. Groups of chronic chagasic mice (6 months

after infection) were treated i.p. with 3 courses of administration with human recombinant G-CSF (Filgastrim; Bio Sidus S.A., Argentina) consisting of 200 µg/kg/day during 5 consecutive days with an interval of 9 days. Control chagasic mice received saline solution in the same regimen.

Morphometric analysis

Groups of mice were euthanized two months after the therapy under anesthesia, 5% ketamine (Vetanarcol®; Konig, Avellaneda, Argentina) and 2% xylazine (Sedomin®; Konig) and hearts were removed and fixed in 10% buffered formalin. Heart sections were analyzed by light microscopy after paraffin embedding, followed by standard hematoxylin/eosin staining. Inflammatory cells infiltrating heart tissue were counted using a digital morphometric evaluation system. Images were digitized using a color digital video camera (CoolSnap, Montreal, Canada) adapted to a BX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Morphometric analyses were performed using the software Image Pro Plus v.7.0 (Media Cybernetics, San Diego, CA). The inflammatory cells were counted in ten fields (400x magnification) per heart. The percentage of fibrosis was determined using Sirius red-stained heart sections and the Image Pro Plus v.7.0 Software to integrate the areas, 10 fields per animal were captured using a 200x magnification. All the analyses were done double-blinded.

Confocal immunofluorescence analyses

Frozen or formalin-fixed paraffin embedded hearts were sectioned and 4 µm-thick sections were used for detection of syndecan-4, ICAM-1, galectin 3, CD3, Foxp3 and IL-10 expression by immunofluorescence. First, paraffin embedded sections were deparaffinized and a heat-induced antigen retrieval step by incubation in citrate buffer (pH=6.0) was performed. Then, sections were incubated overnight with the following

primary antibodies: anti-syndecan-4, diluted 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-ICAM-1, 1:50 (BD Biosciences), anti-CD3, diluted 1:400 (BD Biosciences), anti-Foxp3, 1:400 (Dako, Glostrup, Denmark) or anti-IL-10, diluted 1:100 (BD Biosciences). On the following day, sections were incubated, for 1 h, with Alexa fluor 633 or 488 conjugated Phalloidin, diluted 1:200, mixed with one of the secondary antibodies: Alexa fluor 594-conjugated anti-goat IgG, 1:200 or Alexa fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG, 1:200 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). Nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (VectaShield Hard Set mounting medium with DAPI H-1500; Vector Laboratories, Burlingame, CA). The presence of fluorescent cells was determined by observation on a FluoView 1000 confocal microscope (Olympus). Quantifications of galectin-3⁺ cells, syndecan-4⁺ blood vessels and ICAM-1⁺ percentual area were performed in ten random fields captured under 400x magnification, using the Image Pro Plus v.7.0 software.

Cytokine assessment

Cytokines concentrations were measured in total spleen or heart protein extracts. Tissue proteins were extracted at 50 mg of tissue/500 ml of PBS to which 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20 and protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KIU aprotinin A/100 ml) were added. The samples were centrifuged for 10 min at 3000 g and the supernatants were immediately used for ELISA assays or frozen at -70° C for later quantification. IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-10 and IL-17 were quantified in tissue extracts from individual mice with an enzyme immunoassay determined by ELISA using specific antibody kits (R&D System, Minnesota, MN), according to manufacturer's instructions. Briefly, 96-well plates were blocked and incubated at room temperature for 1 h. Samples were added in duplicates and incubated overnight at 4° C. Biotinylated antibodies were added and plates were incubated for 2 h at

room temperature. A half-hour incubation with streptavidin–horseradish peroxidase conjugate was followed by detection using 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine peroxidase substrate and read at 450 nm.

Real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from heart samples with TRIzol reagent (Invitrogen, Molecular Probes, Oregon, USA) and concentration was determined by photometric measurement. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to synthesize cDNA of 1µg RNA following manufacturer's recommendations. RTq-PCR assays were performed to detect the expression levels of *Tbet* (Mm_00450960_m1), *GATA3* (Mm_00484683_m1) and *G-CSF* (Mm_00438334_m1). The qRT-PCR amplification mixtures contained 20 ng template cDNA, Taqman Master Mix (10 µL) (Applied Biosystems) and probes in a final volume of 20 µL. All reactions were run in duplicate on an ABI7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) under standard thermal cycling conditions. The mean Ct (Cycle threshold) values from duplicate measurements were used to calculate expression of the target gene, with normalization to an internal control (*GAPDH*) using the 2^{-DCt} formula. Experiments with coefficients of variation greater than 5% were excluded. A non-template control (NTC) and non-reverse transcription controls (No-RT) were also included.

Flow cytometry analysis

Quantitative analysis of Treg cells was performed in the bone marrow and spleen of G-CSF- or saline-treated chronic chagasic mice, by flow cytometry. Briefly, mice were treated with 1 course of G-CSF or saline and were euthanized under anesthesia the day after the last dose. Bone marrow cells were obtained from femurs of mice. The bone marrow from each bone was collected by flushing the bone with DMEM medium and after

that the cells were purified by centrifugation in Ficoll (Histopaque 1119 and 1077, 1:1; Sigma, St. Louis, MO) gradient at 1,000 g for 15 minutes. The spleens were collected, washed in DMEM and homogenized by pressing through a 40 mm cell strainer. Bone marrow and spleen cells were counted and resuspended in FACS buffer (1% fetal bovine serum in PBS). For flow cytometry, cells were stained with APC labeled anti CD4 and CD25 antibodies (BD Biosciences) for 20 min, at room temperature. Cells were washed and analyzed using a cell analyzer (LSRFortessa, BD Biosciences) with FACSDiva software.

Quantification of parasite load

T. cruzi DNA was quantified in heart samples by qPCR analysis. For DNA extraction, heart fragments were submitted to DNA extraction using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), as recommended by the manufacturer. Briefly, 10mg of each heart sample were submitted to DNA extraction and the DNA amount and purity (260/280nm) were analyzed by Nanodrop 2000 spectrophotometry (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Kapa Probe Fast Universal 2X qPCR master mix was used to perform the qPCR, in 20 µL reactions, including rox low as the passive reference, as recommended by the manufacturer (Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA). Primers were designed based on the report by Schijman et al ¹⁸ and the amounts used per reaction were 0.4 µM of both primers (primer 1 5'-GTTACACACTGGACACCAA-3' and primer 2 5'-TCGAAAACGATCAGCCGAST-3') and 0.2 µM of the probe (SatDNA specific probe 5'-/56-FAM/AATTCCTCC/ZEN/AAGCAGCGGATA/3IABkFQ/-3'), all included in a mini PrimeTime qPCR Assay (IDTDNA, Coralville, USA). One microliter of each point of the standard curve, samples and controls were applied to different wells of a PCR microplate (Axygen, Union City, USA), film sealed and submitted to amplification. Cycles were performed in an ABI 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) as follows: firstly, 3

minutes at 95°C for Taq activation; and secondly, 45 cycles at 95°C for 10 seconds followed by 55°C for 30 seconds. To calculate the number of parasites per mg of tissue, each plate contained an 8-log standard curve of DNA extracted from trypomastigotes of Colombian *T. cruzi* strain (ranging from 4.7×10^{-1} to 4.7×10^6) in duplicate. Data were analyzed using the 7500 software 2.0.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA).

Assessment of trypanocidal activity

T. cruzi epimastigotes (Colombian strain) were maintained at 26 °C in LIT medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Campinas, Brazil), 1% hemin (Sigma), 1% R9 medium (Sigma), and 50 µg/mL of gentamycin (Novafarma, Anápolis, Brazil). Parasites were counted in a hemocytometer and then dispensed into 96-well plates at a cell density of 5×10^6 cells/mL in the absence or presence of the human recombinant G-CSF at 3, 10 or 30 µg/mL, in triplicate. The plate was incubated for 5 days at 26 °C and aliquots of each well were collected and the number of viable parasites was counted in a Neubauer chamber. Trypomastigote forms of *T. cruzi* (Colombian strain) were obtained from supernatants of LLC-MK₂ cells previously infected and cultured in 96-well plates at a cell density of 2×10^6 cells/mL in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% FBS and 50 µg/mL of gentamycin in the absence or presence of the human recombinant G-CSF. After 24 h of incubation, the number of viable parasites, based on parasite motility, was assessed in a Neubauer chamber and compared to untreated parasite culture to calculate the percentage of inhibition. Benznidazole (30 µg/mL) was used as positive control. For in vitro infection, peritoneal macrophages obtained from C57BL/6 mice were seeded at a cell density of 2×10^5 cells/mL in a 24 well-plate with rounded coverslips on the bottom in RPMI supplemented with 10% FBS and 50 µg/mL of gentamycin and incubated for 24 h. Cells were then infected with trypomastigotes (1:10) for 2 h. Free trypomastigotes were removed by successive washes using saline solution. Cultures were

incubated in complete medium alone or with G-CSF (3 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or benznidazole (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 h. The medium was then replaced by fresh medium and the plate was incubated for 3 days at 37°C. Cells were fixed in absolute alcohol and the percentage of infected macrophages and the mean number of amastigotes/100 infected macrophages was determined by manual counting after hematoxylin and eosin staining using an optical microscope (Olympus). The percentage of infected macrophages and the number of amastigotes were determined by counting 100 cells per slide.

Evaluation of anti-*T.cruzi* antibodies

T. cruzi-specific, total IgG, IgG1 and IgG2 antibodies were detected in the sera of naive, G-CSF- or saline-treated chronic chagasic mice by ELISA. Microtiter plates were coated overnight at 4°C with *T. cruzi* trypomastigote antigen (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 50 μl of carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). The plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 and then blocked by incubation at room temperature for 1 h with PBS–5% nonfat milk. After washing, the plates were incubated with 50 μl of a 1:200 (IgG) or 1:100 (IgG1 or IgG2a) dilution of each serum sample at 37°C for 2 h. The plates were washed, and a 1:1000 dilution of goat anti-mouse IgG (Sigma), rat anti-mouse IgG1 or IgG2a (BD Biosciences) were incubated for 1 h at room temperature. After washing, peroxidase conjugated anti-mouse polyvalent immunoglobulins (Sigma) diluted 1:1000 was dispensed into each well and the plate was incubated for 30 min at room temperature followed by detection using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine peroxidase substrate and read at 450 nm.

Statistical analyses

All continuous variables are presented as means \pm SE. Morphometric and cytokine levels were analyzed using 1-way ANOVA, followed by Newman-Keuls multiple-

comparison test with Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All differences were considered significant at values of $p < 0.05$.

Results

Administration of G-CSF reduces inflammation and fibrosis in hearts of chronic chagasic mice

Multifocal inflammation, mainly composed by mononuclear cells, and fibrosis were found in the hearts of *T. cruzi*-infected mice during the chronic phase of the disease (Figures 1A-B). Administration of G-CSF reduced the number of inflammatory cells and the area of fibrosis in chronic chagasic hearts (Figures 1C-D). Morphometric analysis showed a statistically significant reduction of inflammation and fibrosis area after G-CSF treatment, when compared to saline-treated controls (Figures 1E-F).

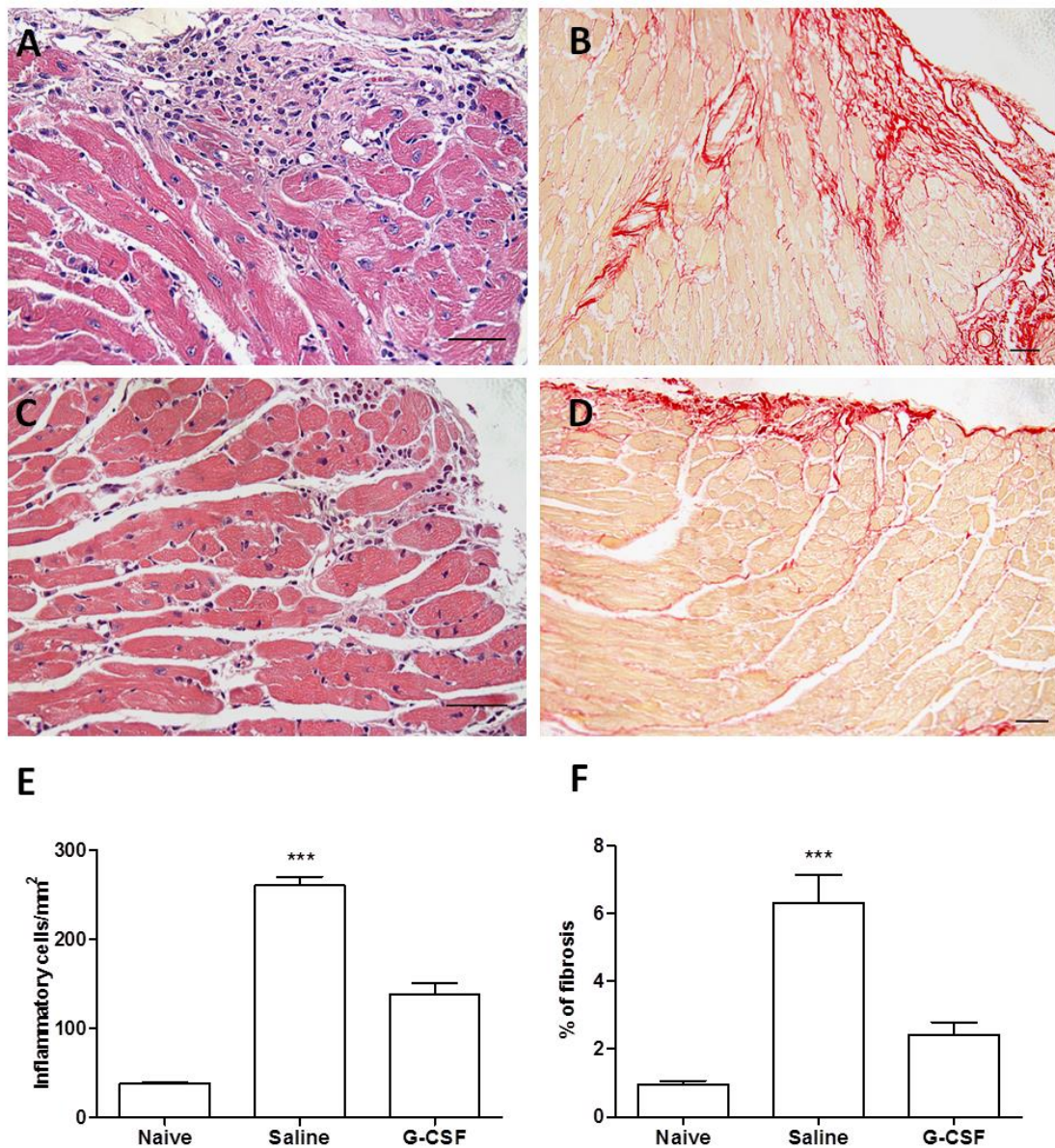


Figure 1: Reduction of inflammation and fibrosis in the hearts of chagasic mice after G-CSF administration. Groups of C57BL/6 mice in the chronic phase of infection (6 months) were treated with saline (A and B) or G-CSF (C and D). A and C, heart sections stained with H&E; B and D, heart sections stained with Sirius red. E, Quantification of inflammatory cells was performed in heart sections of naive mice or saline-treated or G-CSF-treated chagasic mice and integrated by area. F, Fibrotic area was represented by percentage of collagen deposition in heart sections. Bars represent the mean \pm SEM of 9-10 mice/group. *** $p < 0.001$.

Reduction of syndecan-4, ICAM-1 and galectin 3 expression in the hearts of G-CSF-treated mice

We have previously shown the overexpression of syndecan-4, ICAM-1 and galectin 3 in the hearts of chronic chagasic mice.¹⁹ To evaluate the effects of G-CSF on the expression of these inflammation markers, we performed analysis by confocal microscopy in heart sections of mice of the three different groups. A marked decrease in syndecan-4 production, highly expressed in blood vessels of chagasic hearts, was seen after G-CSF treatment (Figures 2A-B). Morphological analyses showed a difference of statistical significance (Figure 2C). Similarly, the expression of ICAM 1, mainly expressed in inflammatory cells and cardiomyocytes in hearts of chronic chagasic mice, was significantly decreased after G-CSF treatment (Figures 2D-F). Moreover, the high expression of galectin 3 on inflammatory cells was down-modulated in hearts of mice treated with G-CSF, correlating with the decrease of inflammation (Figures 2G-I).

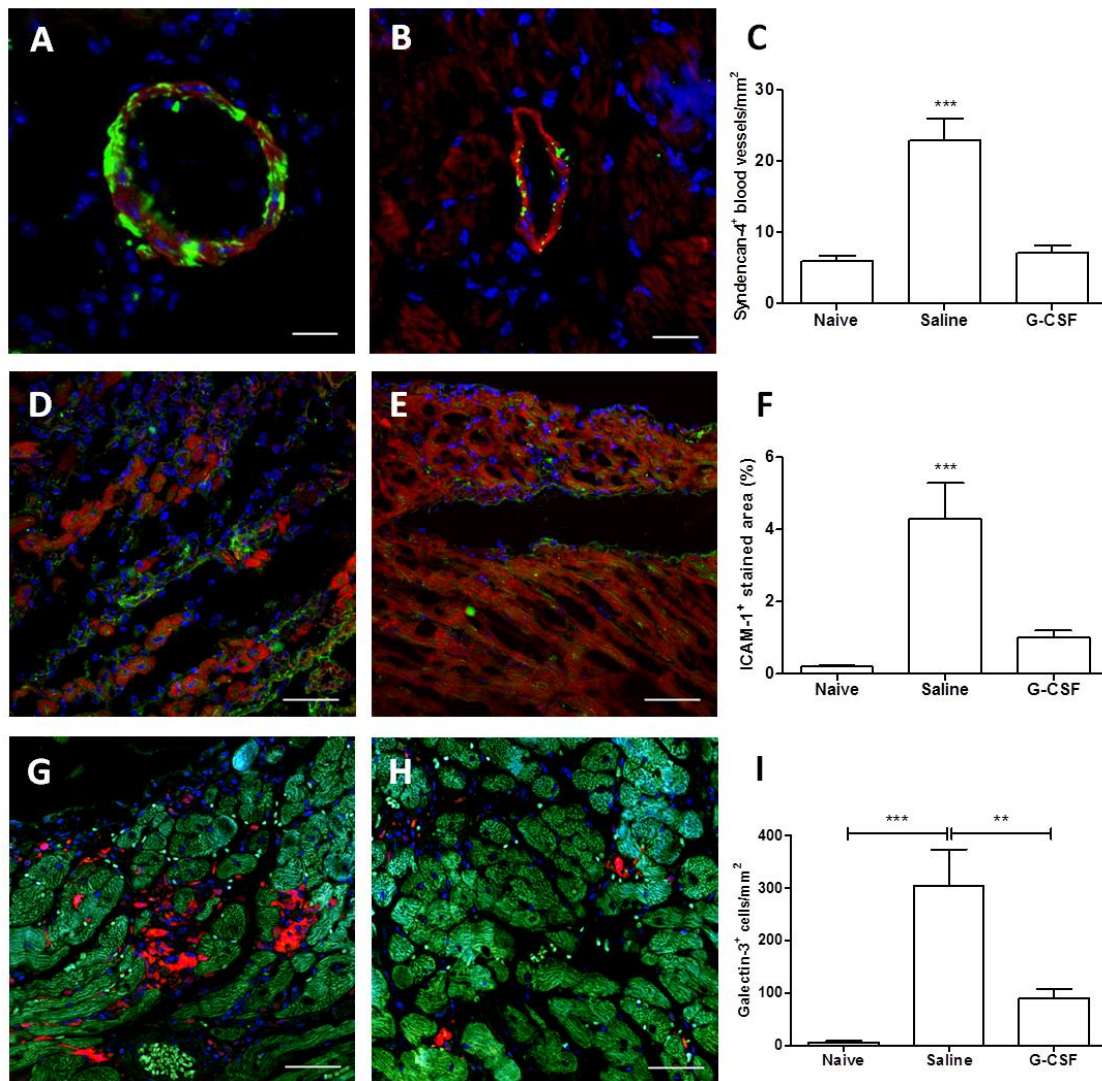


Figure 2: Reduction of Syndecan-4, ICAM-1 and galectin 3 in the hearts of chronic chagasic mice after G-CSF administration. Heart sections of saline-treated (A, D and G) or G-CSF-treated (B, E and H) mice were stained with anti-syndecan-4 (green; A and B), anti-ICAM-1 (green; D and E) or anti-galectin 3 (red; G and H) antibodies. F-actin stained with phalloidin 633 (red, A, B, D and E) or 488 (green, G and H). All sections were stained with DAPI for nuclear visualization (blue). Scale bars represent 50 μ m. Morphometric analyses (C, F and I) in heart sections of naive mice or chagasic mice treated with saline or G-CSF. Bars represent the mean \pm SEM of 3 animals/group. *** $p < 0.001$.

Modulation of cytokine production after G-CSF administration

Chronic chagasic cardiomyopathy has been associated with increased production of IFN- γ and TNF α both in mice, as well as in humans.^{19,20} The concentrations of these two pro-inflammatory cytokines were increased in heart extracts of saline-treated chagasic mice, compared to normal mice. The administration of G-CSF promoted a statistically significant reduction in the concentrations of both cytokines (Figures 3A-B). In contrast, a significant increase in TGF β and IL-10 concentrations was found in the hearts of G-CSF-treated chagasic mice, compared to saline-treated controls (Figures 3C-D). No significant differences were found in IL-17 and IL-4 concentrations (Figures 3E-F). Moreover, the analysis by RT-qPCR showed a significant decrease in *Tbet* gene expression after G-CSF administration (Figure 3G), but no significant alterations in *GATA3* gene expression were observed in the hearts of chronic chagasic mice (Figure 3H).

The systemic effects of G-CSF on cytokine production were also investigated. G-CSF reverted the overexpression of TNF α and IL-17 in the spleens of chagasic mice, when compared to uninfected and saline-treated mice (Figures 4A-B). This effect was also correlated with an increase in IL-10 production promoted by G-CSF (Figure 4C). Additionally, G-CSF administration also induced the increase in *G-CSF* gene expression in the spleens of chagasic mice (Figure 4D).

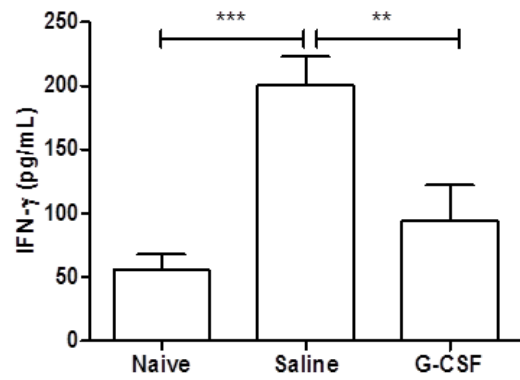
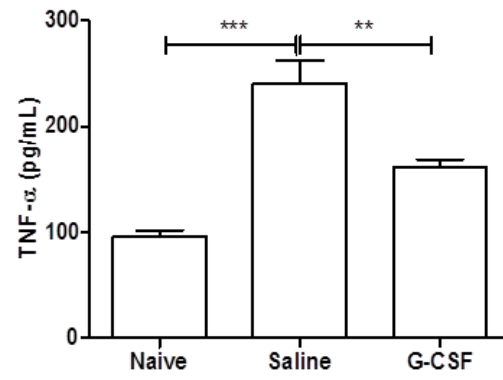
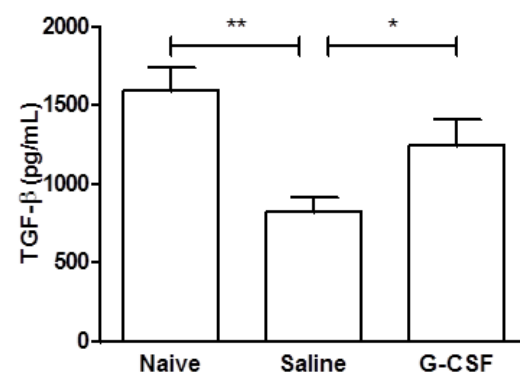
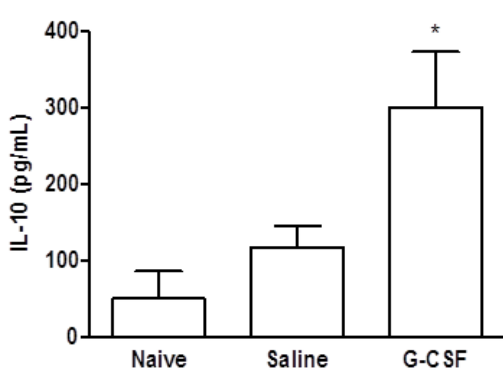
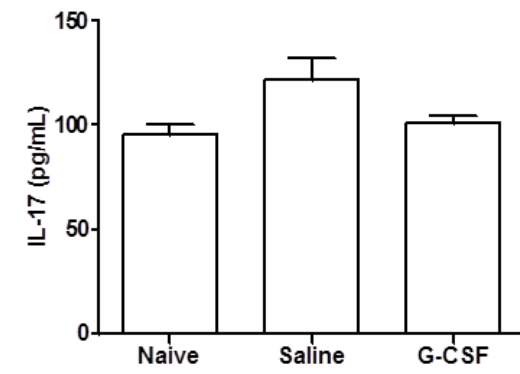
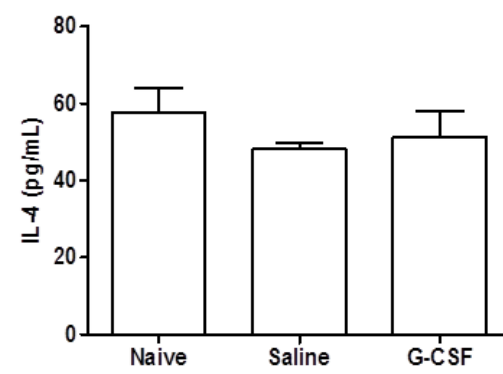
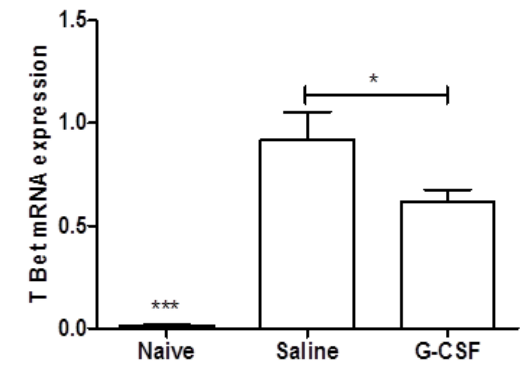
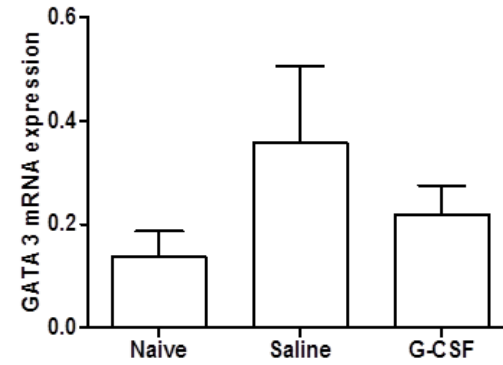
A**B****C****D****E****F****G****H**

Figure 3: Modulation of cytokine production after G-CSF treatment. The concentrations of IFN- γ (A), TNF- α (B), TGF- β (C), IL-10(D),IL-17(E) and IL-4 (F) were determined in heart homogenates from naive (n=3) or chagasic mice treated with saline (n=7) or G-CSF (n=10), by ELISA. The analysis of *Tbet*(G), *Gata-3* (H) was performed by quantitative real time RT-PCR using cDNA samples prepared from mRNA extracted from hearts of naive and chronic chagasic mice treated with saline or G-CSF (n=9-10 mice/group). Values represent the mean \pm SEM. * p<0.05; ** p<0.01;*** p<0.001.

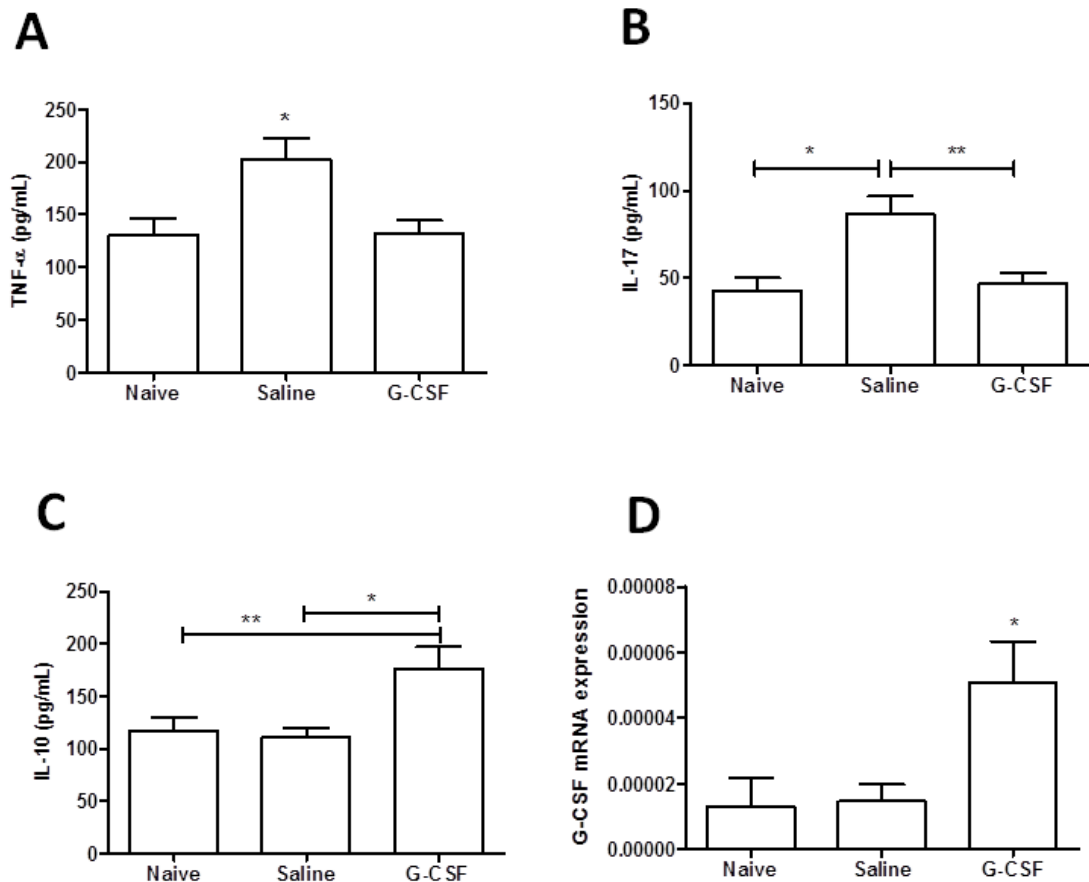


Figure 4: Modulation of cytokine production in the spleens of chronic chagasic mice treated or not with G-CSF. The concentrations of TNF α (A), IL-17 (B) and IL-10 (C) were determined in spleen homogenates from naive (n=3) and chagasic mice treated with saline (n=7) or G-CSF (n=10), by ELISA. (D), G-CSF mRNA expression was determined by quantitative real time RT-PCR using cDNA samples prepared from mRNA extracted from spleens of naive and chronic chagasic mice treated with saline or G-CSF. Values represent the mean \pm SEM. * p < 0.05.

G-CSF therapy increases the percentage of Treg cells in the hearts of chagasic mice

Next, we examined whether G-CSF administration altered the number of Treg cells in chagasic mice. G-CSF caused a decrease on the percentage of CD4⁺CD25⁺ cells in the bone marrow of chagasic mice (Figures 5A-C). The expression of Foxp3 was analyzed in CD3⁺ cells in the hearts by immunofluorescence. A higher percentage of CD3⁺ Foxp3⁺ T cells expressing was found in the hearts of G-CSF-treated mice, compared to saline-treated mice (Figures 5D-F). A partial recovery of CD4⁺CD25⁺ cells in the spleens of chagasic mice was found after G-CSF administration (Figure 5G), and splenic Foxp3⁺ cells co-expressed IL-10 (Figure 5H).

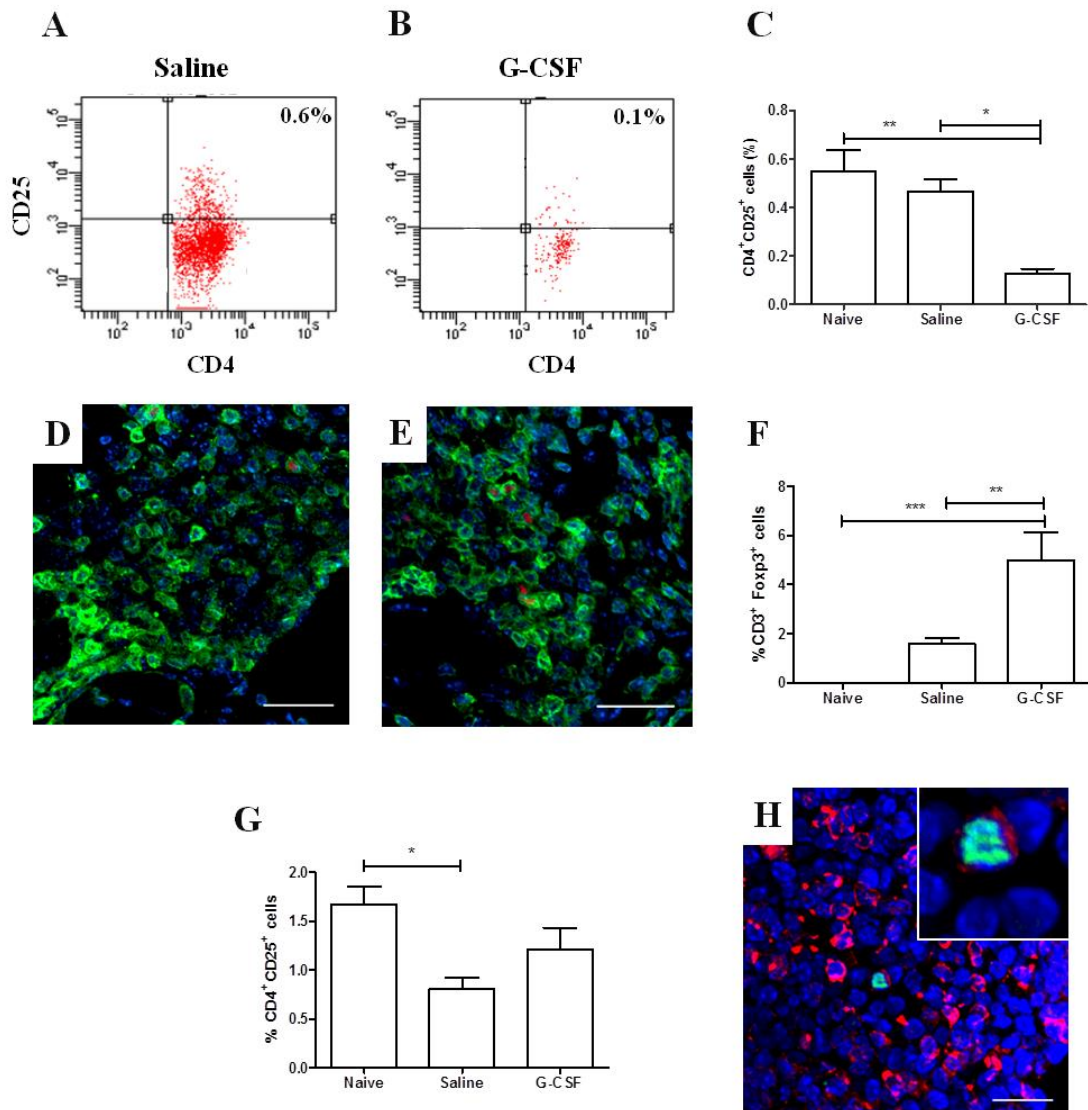


Figure 5: Mobilization of Treg cells after G-CSF administration. Flow cytometry analysis of bone marrow cells obtained from chagasic mice treated with saline (A) or one course of G-CSF (B). C, Quantification of CD4⁺ CD25⁺ cells was evaluated in the bone marrow of naive and chagasic mice treated with saline or G-CSF. Foxp3 expression (red) in CD3⁺ cells (green) was evaluated in heart sections of mice treated with saline (D) or G-CSF (E) by immunofluorescence (n=4/group). Nuclei (blue) were stained with DAPI. (F) Quantification of CD3⁺ FoxP3⁺ cells in hearts of naive and chagasic mice treated with saline or G-CSF. (G), Quantification of CD4⁺ CD25⁺ cells was evaluated in the spleens of naive and chagasic mice treated with saline or G-CSF. Bars represent the mean ± SEM. (H), Spleen section of a G-CSF-treated mouse, stained with anti-Fox3 (green) and anti-IL-10 (red) antibodies. Nuclei (blue) were stained with DAPI. ** p<0.01, *** p<0.001.

Effects of G-CSF administration on the infection by *T. cruzi*

In order to investigate whether the suppressive response induced by G-CSF treatment affected the immune response against the parasite, we first analyzed the levels of parasite-specific antibodies in the sera of mice from the different experimental groups. The levels of total IgG anti-*T. cruzi* antibodies were similar between G-CSF and saline-treated chagasic mice (Figure 6A). A significant increase in IgG1, but not in IgG2 anti-*T. cruzi* antibodies, was found in the group treated with G-CSF compared to saline-treated controls (Figures 6B-C).

To evaluate whether G-CSF administration in chronic chagasic mice affected the residual *T. cruzi* infection, we performed a qRT-PCR analysis to quantify the parasite load in the hearts of mice. As shown in figure 6D, a significant reduction in the parasite load was observed in the hearts of G-CSF-treated mice when compared to saline-treated controls. To determine whether G-CSF has a direct action on the parasite, we analyzed the effects of G-CSF on *T. cruzi* cultures. Addition of different concentrations of G-CSF in axenic cultures of *T. cruzi* epimastigotes had little effect on its viability at 30 µg/mL (Table 1). In contrast, a concentration-dependent trypanocidal effect was seen in cultures of isolated trypomastigotes (Table 1). In addition, when G-CSF was added to cultures of macrophages infected with *T. cruzi*, a significant decrease in the percentage of infected cells, as well as in the number of intracellular amastigotes, was observed (Figures 6E-F).

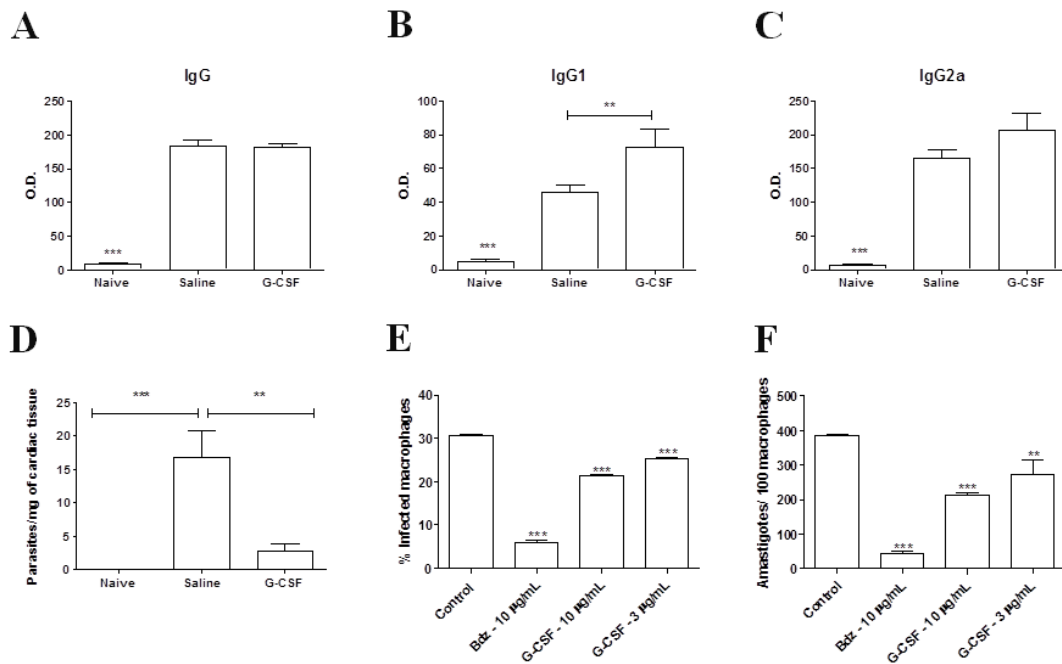


Figure 6: Effects of G-CSF in the production of anti-*T. cruzi* antibodies and in the parasite. A-C, Serum from normal and *T. cruzi*-infected mice treated with saline or G-CSF (3 courses) were obtained two months after treatment. The levels of anti-*T. cruzi* total IgG (A), IgG1 (B) and IgG2 (C) antibodies were determined by ELISA. Bars represent the mean±SEM of 5-10 mice/group. (D), Heart fragments obtained from normal and *T. cruzi*-infected mice treated with saline or G-CSF (3 courses) were used for DNA extraction and RT-qPCR analysis for quantification of the parasite load. E and F, Mouse peritoneal macrophages were infected with *T. cruzi* and treated with G-CSF (3 and 10 μg/mL) or benznidazole (10 μg/mL), a standard drug. The number of infected cells (E) and amastigotes (F) were determined by counting hematoxylin and eosin-stained cultures. Values represent the mean±SEM of triplicate obtained in one of two experiments performed. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 compared to the other groups.

Table 1. Effects of G-CSF in axenic cultures of *T. cruzi* (Colombian strain).

Drug	Concentration	% Inhibition	
		Epimastigotes	Trypomastigotes
G-CSF	3 µg/mL	0.52 (±0.52)	1.90 (± 0.90)
	10 µg/mL	2.58 (± 0.66)	12.85 (± 1.43)*
	30 µg/mL	9.60 (± 1.34)**	24.28 (± 2.51)***
Benznidazole	30 µg/mL	96.78 (± 0.06)***	100***

Values are mean ± SEM of three independent experiments. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Discussion

The hallmark of CCHC is the presence of a multifocal inflammatory response mainly composed by lymphocytes and macrophages, which promote myocytolysis, fibrosis deposition and myocardial remodeling.²¹ This is a progressively debilitating disease which occurs in a phase of the disease when parasitism is very scarce. Although the mechanisms of pathogenesis are still a matter of debate,²² the correlation of severity of the disease and IFN γ production has been well demonstrated.^{23,24} The fact that the parasite persists in *T. cruzi*-infected individuals renders any immunosuppressive condition of risk for reactivation of parasitemia.^{25,26}

In the present study we have demonstrated that systemic administration of G-CSF, a cytokine widely used in the clinical setting, modulates the inflammatory response, decreasing the production of key inflammatory mediators such as IFN γ and TNF α , in the main target organ, the heart. Different cytokine profiles are involved in the control of both the immune response and pathology during *T. cruzi* infection. The control of parasitism during the acute phase of Chagas disease is critically dependent on effective macrophage activation by cytokines such as IFN- γ and TNF α , crucial for limiting parasite replication.^{20,27} On the other hand, an intense Th1 response will enhance heart inflammation.²³ An exacerbated production of IFN- γ against *T. cruzi* antigens favors the development of a strong Th1 response in symptomatic cardiac patients, which leads to progression of heart disease.^{20,28} Despite the suppression of IFN γ and TNF α seen after G-CSF administration in chagasic mice, this therapy did not increase the parasite load,¹⁷ suggesting a partial or selective downregulation of immune responses in chronic chagasic mice. Moreover, G-CSF did not interfere with macrophage and lymphocyte activation in

vitro, suggesting that this cytokine does not modulate directly the production of pro-inflammatory mediators (data not shown).

Previous reports have shown immune deviation induced after treatment with G-CSF.²⁹ In our model of Chagas disease, we did not observe an increase in IL-4, a marker of Th2-type responses. In addition, we found a significant decrease on the mRNA for Tbet, a transcriptional factor essential for Th1-polarized immune responses, but we did not find a significant difference on the gene expression levels for GATA3, essential for Th2 responses, in the hearts of G-CSF-treated mice. Therefore, our results do not indicate a shift towards a Th2 profile after G-CSF administration in chagasic mice, but rather a suppression of the Th1 type immune response found in chronic chagasic mice.

In addition to cytokines, adhesion molecules important to cell migration, such as syndecan 4 and ICAM 1, already shown to be elevated in the hearts of chronic chagasic mice,^{19,29} were downmodulated after G-CSF therapy. TNF α induces ICAM-1 expression thus increasing the adhesiveness of endothelium for leukocytes.³⁰ Syndecan 4 is a transmembrane heparan sulfate proteoglycan that acts cooperatively with integrins in generating signals necessary for the assembly of actin stress fibers and focal adhesions.³¹⁻³³ Since TNF α upregulates syndecan 4 expression,³⁴ the decrease on its expression in endothelial cells in the hearts of chagasic mice may be a consequence of the TNF α downregulation observed after G-CSF administration. Altogether, the decrease of syndecan 4 and ICAM1 may contribute to a reduction of cell migration into the myocardium and, consequently, of inflammation.

Another important action of G-CSF in the model of Chagas disease, as well as in other models of ischemic heart disease, is the induction of fibrosis reduction.^{17,35} This may be due to the modulation of fibrogenic mediators in the heart, such as galectin-3, which has

been shown to play important roles in fibrosis deposition, as well as in heart failure.³⁶ Galectin-3 expression was found in activated myocardial macrophages and is increased by IFN γ .^{37,38} In addition, the administration of recombinant galectin-3 in rats induced cardiac fibroblast proliferation, collagen production and left ventricular.³⁷ Moreover, galectin-3 is known to play important roles in the regulation of inflammatory responses, including suppression of T cell apoptosis.^{38,39} In fact, in our previous study we observed an increase of apoptosis in the hearts of chagasic mice treated with G-CSF,¹⁷ correlating with the decrease of galectin 3 found herein.

The suppression of inflammatory mediators observed herein after G-CSF administration was accompanied by an increase of IL-10 production in the hearts and spleens of chagasic mice. This is an important regulatory cytokine already shown to be associated with a better evolution of chronic chagasic patients.²⁰ The co-expression of IL-10 in Treg cells, which are increased in percentage after G-CSF treatment in the present study, suggests these cells as one source of IL-10. In fact, the production of IL-10 has been described as one of the mechanisms by which Treg cells exert their suppressive activity.⁴⁰

Regulatory T cells (Treg) constitute an antiinflammatory T cell population, associated with immune regulation, which may prevent tissue damage caused by parasite-triggered immune responses.⁴¹ Treg cells expressing CD4⁺CD25⁺ cells have been recently associated with the expression of the regulatory lineage factor Foxp3 and are responsible for maintaining self-tolerance.^{42,43} The increased percentage of Treg cells in the spleens and lymph nodes of G-CSF-treated mice by mobilization of bone marrow resident Treg cells has been previously described.⁴⁴ This mobilization of Treg cells after G-CSF administration seems to be due to a reduced expression of SDF1, the CXCR4 ligand, in the bone marrow. Rutella and coauthors.⁴⁵ have reported that G-CSF induces an increase of Treg cells in the peripheral blood of normal human recipients. Recent investigations

evaluating the frequency of Treg cells during early and late indeterminate Chagas disease have shown the correlation between the severity of the chronic chagasic cardiomyopathy with a lower frequency or suppressive activity of CD4⁺CD25⁺ cells.⁴⁶⁻⁴⁸ Thus, our data corroborate with these findings, since an inverse correlation between the percentage of Tregs and inflammation cells and cytokines in the heart of chagasic mice was found when G-CSF and saline-treated mice were compared.

One important issue raised was whether the suppressive effects of G-CSF could interfere with the control of *T. cruzi* infection. The levels of anti-*T. cruzi* IgG antibodies in the sera of chagasic mice were not reduced by treatment with G-CSF. More importantly, by using a very sensitive quantification method,¹⁸ we found a decrease in the parasite load in the hearts of chronic chagasic mice treated with G-CSF when compared to saline-treated mice, suggesting that this cytokine could have a direct effect on parasite elimination. To address this question, we evaluated the effects of G-CSF in vitro, in the three forms of the parasite. Although G-CSF had little effect on the viability of epimastigote form, it did affect significantly the forms found in the mammalian hosts (trypomastigotes and amastigotes) in a concentration-dependent manner. In fact, previous reports have shown that other cytokines, such as GM-CSF and TNF α , can have direct effects on the parasite and interfere with *T. cruzi* infection.⁴⁹ Altogether, our data indicate that reduction of parasitism may be a positive effect of G-CSF therapy.

In conclusion, the present study reinforces our previous work, in which we demonstrated improvement of cardiopulmonary function after G-CSF administration, by revealing its potent antiinflammatory properties in a model of parasite driven heart disease. More importantly, we evidenced the modulation of pathogenic immune responses without affecting the control of infection, a feature highly desired in the clinical setting. Altogether,

our results reinforce the possibility of clinical applications of G-CSF, a well-tolerated drug with low side effects, in the treatment of Chagas cardiomyopathy patients.

Acknowledgments

J.F.V. was recipient of a CAPES doctoral scholarship (UEFS/PPgBIOTEC). B.S.F.S. is holding a CNPq doctoral scholarship and C.S.M. is holding a FAPESB master scholarship. M.B.P.S. and R.R.S. are recipients of a CNPq senior fellowship.

Funding

This work was supported by grants from the Brazilian Ministry of Sciences and Technology (MCT), Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), and Fundação de Amparo as Pesquisas da Bahia (FAPESB).

Authorship

Contribution: M.B.P.S., R.R.S., B.S.F.S., and J.F.V. designed the study. J.F.V., B.S.F.S., T.F.S.L., L.S.G., C.M.K., G.P.S., A.A., C.S.M., and S.G.M. performed experiments, supplied reagents, tools, laboratory analyses, and analyzed the data. J.F.V. and M.B.P.S. wrote the paper. All authors revised the paper.

Conflict of interests

The authors declare no competing financial interests.

References

- 1 Franco-Paredes C, Von A, Hidron A, et al. Chagas disease: an impediment in achieving the millennium development goals in Latin America. *J BMC Int Health Hum Rights*.2007;7(7):1-6.
- 2 Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Roses-Periago M. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: estimated disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*.2008;2:e300:1-11.
- 3Franco-Paredes C, Bottazzi ME, Hotez PJ. The unfinished public health agenda of Chagas disease in the era of globalization.*PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(7): e470:1-4.
- 4 World Health Organization. Chagas disease.<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Last accessed in November, 2012.
- 5 Bocchi EA, Bellotti G, Mocelin A et al. Heart transplantation for chronic Chagas' heart disease. *Ann Thorac Surg*. 1996; 61(6):1727-1733.
- 6 Von-Aulock S, Boneberg EM, Diterich I, Hartung T. Granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) treatment primes for increased ex vivo inducible prostanoid release. *J Pharmacol Exp Ther*.2004; 308(2):754-759.
- 7 Hartung T, Docke WD, Gantner F, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood*.1995; 85(9):2482–2489.
- 8 Boneberg EM, Hartung T. Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF.*Inflamm Res*. 2002; 51(3):119-128.

- 9 Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M, et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun.*2004; 325(4):1353-1359.
- 10 Harada M, Qin Y, Takano H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med.*2005;11(3):305–311.
- 11 Higuchi T, Yamauchi-Takahara K, Matsumiya G, et al. Granulocyte colony-stimulating factor prevents reperfusion injury after heart preservation. *Ann Thorac Surg.*2008; 85(4):1367-1373.
- 12 Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol.*2005; 175(11):7085-7091.
- 13 Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.*2005; 6(4):345-352.
- 14 Rutella S, Pierelli L, Bonanno G, et al. Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells. *Blood.*2002;100(7):2562–2571.
- 15 Rossetti M, Gregori S, Roncarolo MG. Granulocyte-colony stimulating factor drives the in vitro differentiation of human dendritic cells that induce anergy in naive T cells. *Eur J Immunol.* 2010; 40(11):3097-3106.
- 16 Macambira SG, Vasconcelos JF, Costa CR, et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. *FASEB J.*2009;23(11):3843-3850.
- 17 Federici EE, Abelmann WH, Neva FA. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1964; 13(2):272-280.

- 18 Schijman AG, Bisio M, Orellana L, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(1): e931:1-13.
- 19 Soares MB, de Lima RS, Rocha LL, et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J Infect Dis*. 2010; 202(3):416-426.
- 20 Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Cançado JR, et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J Infect Dis*. 2000;182(2):634–638.
- 21 Köberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol*.1968; 6:63-116.
- 22 Soares MB, Silva-Mota KN, Lima RS, Bellintani MC, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by IL-4: dissociation between inflammatory and tissue parasitism. *Am J Pathol*.2001; 159(2):703–709.
- 23 Soares MBP, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc*. 2001; 73(4): 547-559.
- 24 Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Rocha MOS, et al. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1998; 31(1):127-131.
- 25 Galhardo MCG, Martins IA, Hasslocher-Moreno A, et al. Reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32(3): 291-294.
- 26 Campos SV, Strabelli TM, Amato Neto V, et al. Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*.2008;27(6):597-602.

- 27 Tadokoro CE, Abrahamsohn IA. Bone marrow-derived macrophages grown in GM-CSF or M-CSF differ in their ability to produce IL-12 and to induce IFN-gamma production after stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. *Immunol Lett.*2001;77(1):31-38.
- 28 Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response.*Infect Immun.* 2003; 71(3):1185-1193.
- 29 Soares MB, Lima RS, Souza BSF, et al. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. *Cell Cycle.*2011; 10(9):1448-1455.
- 30 Ledebur HC, Parks TP. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells.Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers.*J Biol Chem.* 1995; 270(2):933–943.
- 31 Horowitz A, Tkachenko E, Simons M. Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4.*J Cell Biol.*2002; 157(4):715-725.
- 32 Ishiguro K, Kojima T, Muramatsu T. Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms. *Glycoconj J.* 2003; 19(4-5):315-318.
- 33 Hamon M, Mbemba E, Charnaux N, et al. A syndecan-4/CXCR4 complex expressed on human primary lymphocytes and macrophages and HeLa cell line binds the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Glycobiology.*2004; 14(4):311-13.
- 34 Zhang Y, Pasparakis M, Kollias G, Simons M. Myocyte-dependent regulation of endothelial cell syndecan-4 expression.Role of TNF-alpha.*J Biol Chem.*1999; 274:14786-14790.

- 35 Angeli FS, Amabile N, Shapiro M, et al. Cytokine combination therapy with erythropoietin and granulocyte colony stimulating factor in a porcine model of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010; 24(5-6):409–420.
- 36 Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2001; 69(4):555-564.
- 37 Sharma UC, Pokharel S, Brakel TJV, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation.* 2004; 110(19):3121-3128.
- 38 Reifenberg K, Lehr HA, Torzewski M, et al. Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *Am J Pathol.* 2007; 171(2):463-472.
- 39 Rabinovich GA, Ramhorst RE, Rubinstein N, et al. Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ.* 2002; 9(6):661-670.
- 40 Morris ES, MacDonald KP, Rowe V, et al. Donor treatment with pegylated G-CSF augments the generation of IL-10-producing regulatory T cells and promotes transplantation tolerance. *Blood.* 2004; 103(9):3573-3581.
- 41 Belkaid Y, Blank RB, Suffia I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol Rev.* 2006; 212(1): 287–300.
- 42 Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* 1999; 162(9):5317-5326.
- 43 Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009; 30(5):636-645.

- 44 Zou L, Barnett B, Safah H, et al. Bone marrow is a reservoir for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res.* 2004; 64(22):8451-8455.
- 45 Rutella S, Bonanno G, Pierelli L, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN-alpha. *Eur J Immunol.* 2004; 34(5):1291-1302.
- 46 Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JCP, et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺CD16⁻CD56⁺natural killer T cells and CD4⁺CD25^{High} regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2005; 62(3): 297–308.
- 47 De-Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(5):e992:1-8.
- 48 Guedes PM, Gutierrez FR, Silva GK, et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(4):e1630:1-11.
- 49 Olivares-Fontt EO, de Baetselier P, Heirman C, Thielemans K, Lucas R, Vray B. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Infect Immun.* 1998; 66(6):2722-2727.

4DISCUSSÃO GERAL

A doença de Chagas é uma doença debilitante e incapacitante, com alternativas terapêuticas limitadas na atualidade, o que torna premente o desenvolvimento de novas terapias para essa doença que acomete mais de dez milhões de pessoas no mundo. A única terapia para os pacientes chagásicos crônicos com insuficiência cardíaca avançada é o transplante cardíaco. Neste estudo descrevemos, pela primeira vez na literatura, a utilização de um hormônio celular, o G-CSF, no tratamento da CChC experimental, bem como a investigação de seus mecanismos de ação na doença.

Para o tratamento de doenças crônicas em que a cura ainda não é possível de ser alcançada, a indústria farmacêutica tem apostado no uso de citocinas, tais como os IFNs e a eritropoietina (EPO), como agentes modificadores da resposta biológica. O desafio para a utilização clínica dessas moléculas se deve, em parte, às suas características, em especial ao pleiotropismo e a redundância, que resultam em uma complexa rede de cascata de citocinas e circuitos reguladores, com efeitos de retroalimentação (THOMAS & BECK-WESTERMEYER, 2007; FELDMANN et al.,2008). Dentre as citocinas usadas terapêuticamente, o G-CSF recombinante humano tem uma utilização menos restrita por apresentar menos efeitos colaterais e por ser mais bem tolerado pelos pacientes. O G-CSF recombinante humano é empregado em larga escala na prática clínica há mais de duas décadas, apresentando atividade benéfica em várias situações clínicas, tais como neutropenia idiopática, mielossupressão induzida por quimioterapia, recuperação da aplasia pós-transplante de medula óssea e mobilização de células progenitoras hematopoiéticas para a circulação periférica (ANDERLINI & CHAPLIN, 2008). Dada à larga experiência pré-existente da sua utilização clínica e segurança da sua utilização, pode-se propor a transposição dos resultados obtidos em nosso estudo para a realização de estudos clínicos em pacientes chagásicos crônicos.

O modelo de CChC é bem descrito na literatura, onde camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados com *T. cruzi* da cepa Colombiana desenvolvem, após seis meses de infecção, um quadro característico de CChC com inflamação e fibrose no coração, semelhante ao observado em humanos (SOARES et al.,2004; ROCHA et al.,2006). Nesse modelo, observamos que o tratamento por três ciclos de G-CSF proporcionou diversos efeitos benéficos, dentre eles a melhora da função cardiorespiratória dos animais. O consumo máximo de oxigênio, o maior volume de oxigênio por unidade de tempo que um

indivíduo consegue captar durante o exercício, é alcançado quando se atingem níveis máximos de débito cardíaco e é considerado um índice muito empregado para classificar a capacidade funcional cardiorrespiratória do indivíduo. Os animais tratados com G-CSF apresentaram melhor desempenho em esteira ergométrica já que foram capazes de se exercitar por mais tempo, o que possibilitou que percorressem uma distância maior do que os animais tratados apenas com salina. Demonstramos aqui que o tratamento com G-CSF causou uma melhora funcional, também avaliada pelo aumento do consumo de VO_2 e CO_2 nos animais tratados com G-CSF. Quanto mais grave for a insuficiência cardíaca nos pacientes com CChC pior será sua capacidade de exercício, acarretando ao longo do tempo a perda da capacidade laboral, apresentando o G-CSF um efeito protetor.

A CChC é caracterizada por uma variedade de anormalidades estruturais que geram desvio de eixo e condução lenta, além do aparecimento de arritmias ventriculares que podem levar à morte súbita (RASSI et al.,2001). Os camundongos que receberam G-CSF apresentaram uma diminuição significativa no percentual de fibrose no coração, associada à indução de efeitos benéficos funcionais no coração, conforme observado através de avaliação por eletrocardiografia (MACAMBIRA et al.,2009). Todos os animais chagásicos crônicos apresentaram alterações elétricas que variaram de bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau a dissociação átrio-ventricular. Comparativamente, enquanto os animais tratados com salina permaneceram com os distúrbios de condução ou agravaram seu quadro, os animais tratados com G-CSF tiveram a gravidade de seus distúrbios diminuída e alguns reverteram completamente o distúrbio de condução antes apresentado.

A origem das arritmias parece ser dependente de alteração nas conexinas, proteínas presentes nas junções comunicantes, e uma vez que haja menor acoplamento elétrico entre os cardiomiócitos, há falta de coordenação entre as células cardíacas. A infecção pelo *T. cruzi* está associada a uma diminuição da expressão de Cx43 em cardiomiócitos em modelo animal e em humanos (KUHLMANN et al.,2006; WAGHABI et al.,2009). A utilização de G-CSF em modelo de infarto do miocárdio também proporcionou a reversão de arritmias, fato este que foi associado o aumento da expressão de Cx43 como uma das possíveis causas da reversão dos distúrbios elétricos encontrados (KUHLMANN et al.,2006; KUWABARA et al.,2007). De maneira discordante, não encontramos diferença na expressão do mRNA da Cx43 nos corações dos grupos experimentais e nem tampouco na presença da Cx43 no tecido, não nos permitindo associar a melhora dos distúrbios de condução nos animais tratados com G-CSF com alterações na expressão gênica ou produção de Cx43 (dados não mostrados). Dados de cultura de cardiomiócitos de rato

infectados com *T. cruzi* sugerem que nem a transcrição nem a tradução da conexina 43 (Cx43) são alteradas, porém foi observada uma alteração na localização subcelular dessa proteína, com conseqüente desorganização da junção comunicante e perda do acoplamento elétrico entre tais células (CAMPOS-DE-CARVALHO et al., 1994).

De maneira indireta, nossos dados corroboram a hipótese da importância do mimetismo molecular para o desencadeamento das arritmias cardíacas em modelos de CChC, já que demonstramos que a diminuição da presença de anticorpos anti- $\beta 1$ e anti-M2, assim com a redução de anti-P2 β nos animais tratados com G-CSF estão associados à melhora da função cardíaca desses animais. Apesar de seus mecanismos de ação não estarem completamente esclarecidos, estudos indicam que esses anticorpos podem ativar vias intracelulares por ativação de proteína G e conseqüente alteração na eletrogênese cardíaca (MACIEL et al., 2012) e, portanto, a redução da presença de tais anticorpos nos animais tratados com G-CSF pode estar associada à melhora dos distúrbios arritmogênicos.

A resposta inflamatória é um marco central nas lesões cardíacas durante a CChC, sendo a dinâmica desse processo capaz de induzir ao remodelamento do miocárdio, com especial participação de linfócitos T e macrófagos como agentes indutores de miocardite, hipertrofia dos cardiomiócitos, culminando no processo de fibrose (ANDRADE, 1983; HIGUCHI et al., 2003). A perda de cardiomiócitos durante a infecção pelo *T. cruzi* também contribui para o agravamento das lesões no miocárdio e conseqüente disfunção cardíaca. Harada e colaboradores (2005) não observaram a proliferação de cardiomiócitos após o tratamento com G-CSF em camundongos infartados, induzindo os autores a atribuir a melhora observada na função cardíaca à ação direta do G-CSF como agente anti-apoptótico, tanto em cardiomiócitos quanto em células endoteliais.

A ligação do G-CSF com seu receptor em cardiomiócitos ativa a via JAK2/ STAT1 e 3, induzindo a produção de Bcl2, proteína anti-apoptótica, protegendo dessa maneira as células cardíacas. Esse mesmo efeito anti-apoptótico do G-CSF também foi descrito em neurônios e neutrófilos por diversos mecanismos tais como a produção de survivina, da proteína anti-apoptótica Mcl-1, bloqueio da translocação de Bax e inibição da ativação da caspase 9/3 (MAIANSKI et al., 2002; MAIANSKI et al., 2004; XIAO et al., 2007; JUN et al 2011). Ao contrário da doença isquêmica, na CChC observa-se uma baixa taxa de cardiomiócitos apoptóticos (da SILVA & GORDON, 1999), entretanto esse possível efeito benéfico do G-CSF na diminuição da apoptose de cardiomiócitos não foi analisado em nosso modelo. Novos estudos deverão ser realizados com o objetivo de entender se o

tratamento com G-CSF no modelo de CChC promove a proliferação ou a geração de cardiomiócitos.

A comparação entre a expressão gênica em corações de animais normais e chagásicos possibilitou a observação de diferença significativa na expressão de genes associados tanto com a resposta imune-inflamatória quanto com a fibrose, com o aumento de expressão de moléculas de adesão e de fatores quimiotáticos em corações chagásicos crônicos (SOARES et al.,2010). Nesse trabalho demonstramos que o tratamento com G-CSF reduziu a produção de ICAM-1 e syndecan-4 no coração, contribuindo para um menor aporte de células inflamatórias no coração. A produção de CXCL12, uma quimiocina com ação recrutadora de células-tronco, foi diminuída no coração dos animais após o tratamento com G-CSF, o que, segundo Mieno e colaboradores (2006), também está relacionado a um menor recrutamento de células inflamatórias para o coração. De maneira semelhante, no modelo de CChC, o aumento de CXCL12, do ICAM-1 e de syndecan-4 nos animais chagásicos crônicos tratados com salina proporcionam um maior recrutamento de células inflamatórias, contribuindo para a manutenção do infiltrado inflamatório observado nesse modelo, sendo o G-CSF capaz de inibir esse processo e, conseqüentemente, de controlar a lesão tecidual.

A possibilidade de reversão dos danos causados pela resposta inflamatória no coração tem sido objeto de intensa investigação nas últimas décadas. Além do menor aporte e permanência de leucócitos no coração, demonstramos também uma maior taxa apoptótica de leucócitos no coração dos animais tratados. Esses resultados corroboram os dados de Rutella e colaboradores (2001), nos quais observou-se que a indução da apoptose de linfócitos T pelo G-CSF por consequência do aumento da expressão da bax, desregulação do potencial das membranas mitocondriais e clivagem da caspase-3 com conseqüente fragmentação do DNA. Durante o processo de apoptose, as células mortas são eliminadas por fagocitose sem provocar uma resposta inflamatória nociva, eliminando desta forma, linfócitos indesejáveis a fim de evitar respostas patológicas. Por ser capaz de induzir a apoptose das células inflamatórias no miocárdio chagásico, que é composto principalmente por células mononucleares, o G-CSF tem desta forma, uma ação inibitória da progressão da lesão.

Diversos grupos demonstraram que o G-CSF induz uma mudança de resposta imune para o perfil Th2 da resposta imune com aumento da produção de IL-4 e IL-10, acompanhado por um decréscimo na produção de IFN- γ in vitro (PAN et al.,1995; SLOAND et al.,2000). No modelo de CChC, ao invés de uma forte resposta Th2,

descrevemos aqui a inibição do perfil Th1 pelo G-CSF associada ao controle da resposta inflamatória. Não foi observado o aumento de IL-4 nos animais tratados, sendo a produção de IFN- γ , que é a principal citocina Th1, reduzida após o tratamento com G-CSF, assim como a expressão de Tbet, um fator transcricional essencial para a diferenciação de células Th1. Além disso, observamos uma redução de TNF- α , que é uma citocina com múltiplos efeitos no coração após interação com seu receptor tipo 1 (TNFR1), como indução do aumento da expressão endotelial das quimiocinas CCL3 e CCL2, como também a expressão de moléculas de adesão em cardiomiócitos resultando em aumento do infiltrado leucocítico no coração (HIGUCHI et al., 2004; BILATE et al., 2007).

Na doença de Chagas a persistência do infiltrado macrofágico no coração, está associado a indução de cronicidade, sendo evidenciado nesse trabalho, o aumento do número de macrófagos nos animais tratados apenas com salina, associado a uma maior expressão de galectina-3. A galectina-3 é uma molécula pleiotrópica que age como um potente mitógeno para fibroblastos in vitro e tem sido envolvida com uma variedade de processos biológicos incluindo a proliferação, adesão e sobrevivência celular, bem como a desregulação da produção de colágeno (KUWABARA & LIU, 1996; AKAHANI et al., 1997; HSU et al., 1999; HENDERSON & SETHI, 2009; WANG et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011). A galectina 3 está especificamente aumentada em camundongos com falência cardíaca descompensada, fato este que tem sido associado à ativação de fibroblastos e macrófagos, células características do remodelamento cardíaco (de BOER et al., 2011). Segundo Liu e colaboradores (1995), quanto mais diferenciado e ativado for o macrófago, tanto maior será a produção de galectina-3, o que sugere que o G-CSF pode estar diminuindo a ativação de macrófagos, já que esse grupo produziu menos galectina-3, o que justificaria a redução da área ocupada por tecido fibrótico.

Recentemente, o paradigma Th1/Th2 tem sido expandido pela descoberta de outros subgrupos como as células Th17 e as células Treg, que exibem funções distintas das de células Th1 e Th2. Embora as células Th17 possam estar associadas à eliminação de patógenos que não foram eliminados adequadamente por células Th1 ou Th2, a ativação das células Th17 parece contribuir significativamente para a destruição tecidual (KORN et al., 2009). A participação dessas células na imunopatologia da doença de Chagas ainda não é muito clara. Observamos que animais chagásicos apresentaram um aumento da produção de IL-17 quando comparados a camundongos normais, e o grupo tratado com G-CSF teve uma redução significativa da produção desta citocina no baço, mas não no coração. As células Th17 dependem da produção de TGF- β e IL-6 para ativação do fator

de transcrição ROR γ T e produção de IL-17, a falta de TGF- β impede a diferenciação Th17 (LI et al.,2007). Apesar da produção diminuída de IL-17 no coração e baço de animais tratados, não observamos diferença na expressão gênica de ROR γ T entre os grupos (dados não apresentado), sugerindo que o tratamento com G-CSF não altera de forma significativa a sub-população de células Th17.

As células Treg constituem uma linhagem anti-inflamatória de linfócitos T associada à regulação do sistema imune, que atua regulando as respostas inflamatórias para evitar dano causado por intensa ativação celular (BELKAID, BLANK & SUFFIA, 2006). A frequência de células Treg CD4⁺ CD25⁺ no sangue periférico de pacientes chagásicos crônicos que apresentam a forma indeterminada da doença é maior do que naqueles pacientes que desenvolvem a forma sintomática, com manifestações clínicas da doença (VITELLI-AVELAR et al.,2005, de ARAÚJO et al.,2011). Também já é conhecida a ação do G-CSF na promoção do aumento do número de células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ produtores de IL-10 e TGF- β (RUTELLA et al.,2005; TOH et al.,2009), dessa forma decidimos investigar a participação de células Treg na regulação da resposta inflamatória nos animais tratados com G-CSF.

Observamos uma menor frequência de células CD4⁺CD25⁺ na medula óssea de animais tratados com G-CSF em relação aos chagásicos injetados com salina, coerente com a ação descrita do G-CSF no recrutamento de tais células para a circulação periférica (KARED et al.,2005; RUTELLA et al.,2005). Por ser o baço um órgão de passagem importante para as células presentes na circulação, investigamos a presença de células Treg nesse tecido. Dessa maneira, observamos a presença elevada de células Treg no baço dos animais tratados com G-CSF, bem como o aumento da produção *in situ* de IL-10. Embora outros tipos celulares produzam IL-10, é possível que as Treg estejam contribuindo de maneira mais evidente para este aumento uma vez que observamos a presença de células Foxp3⁺IL-10⁺ nesse órgão. O aumento de células Treg na circulação propicia sua maior chegada ao coração dos animais chagásicos crônicos tratados com G-CSF, conforme demonstramos através da quantificação de células CD3⁺ Foxp3⁺. Portanto, é possível que o aumento no percentual de células Treg no coração contribua com a redução da resposta inflamatória.

Os resultados descritos nesse estudo estão sumarizados na figura 7, onde apresentamos a mobilização de células Treg da medula óssea pela administração do G-CSF *in vivo* proporcionando um efeito modulador da resposta imune a nível sistêmico e local, em uma doença caracterizada por intensa agressão tecidual pela resposta inflamatória.

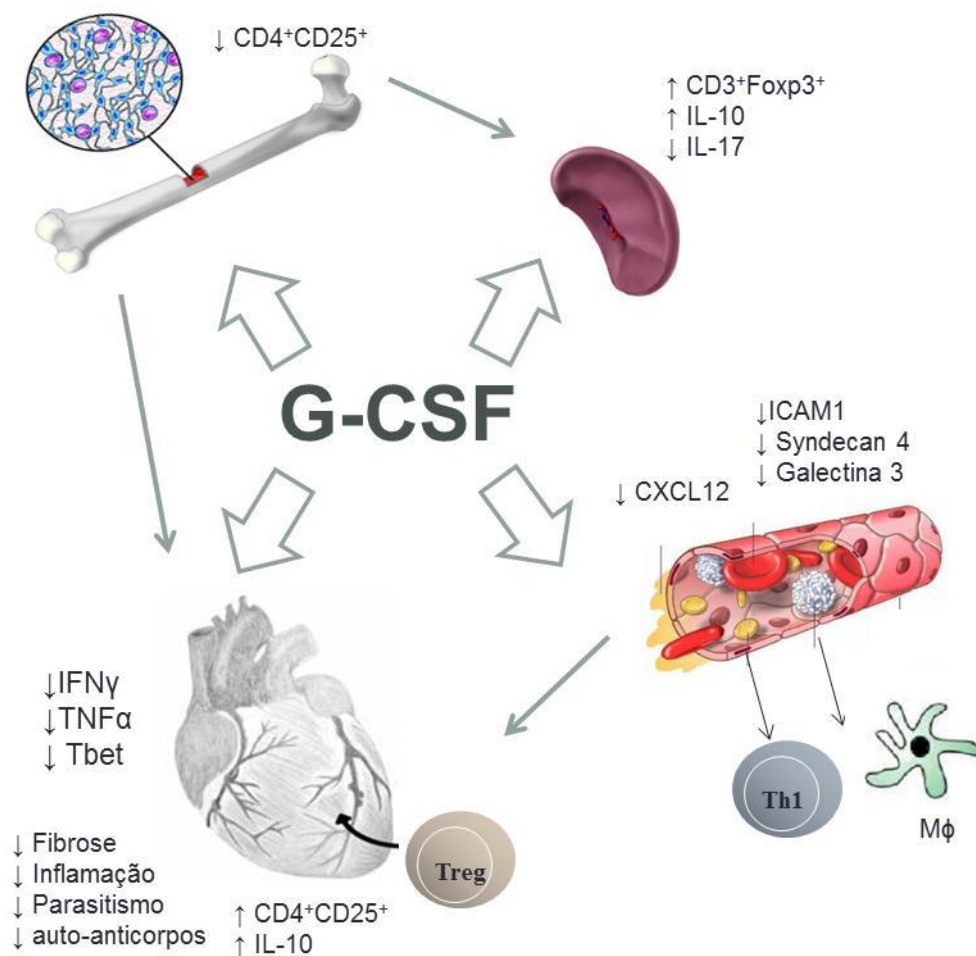


Figura 7. Representação esquemática da ação direta e indireta do G-CSF sobre o tecido cardíaco promovendo modulação da resposta inflamatória local em modelo de CChC experimental.

Uma preocupação inerente à imunomodulação proporcionada pelo tratamento com G-CSF é a possibilidade de reativação dos parasitos restantes, refletido em um aumento da carga parasitária. Para excluir tal possibilidade analisamos a presença de antígenos e DNA de *T. cruzi* no coração dos animais dos diferentes grupos experimentais. Utilizando uma técnica mais sensível (qPCR), demonstramos uma redução significativa na carga parasitária após o tratamento por 3 ciclos de G-CSF sugerindo a possibilidade de atividade tripanocida dessa citocina. Em cultura axênica de epimastigotas não observamos efeito do G-CSF em ensaio cinético (dados não apresentados), no entanto observamos diminuição da viabilidade de tripomastigotas e uma redução significativa no número de macrófagos infectados, assim como na quantidade de formas amastigotas presentes por macrófago infectado in vitro. Esses dados indicam que esta citocina possa estar contribuindo para a eliminação das formas intracelulares do *T. cruzi*, o que de toda forma favorece a redução

do estímulo inflamatório. A manutenção da produção de anticorpos também contribui para a não reagudização da doença. Outras citocinas, tais como GM-CSF e TNF, são capazes de agir diretamente sobre as formas tripomastigotas, promovendo sua lise ou reduzindo sua capacidade infectiva (OLIVARES-FONTT et al., 1998). Novos estudos estão sendo desenvolvidos visando esclarecer os mecanismos envolvidos na redução do parasitismo tecidual em nosso modelo.

Dessa forma, apresentamos mecanismos múltiplos de ação do G-CSF que propicia a melhora do quadro de cardiopatia chagásica crônica em camundongos infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. Os resultados obtidos com o uso do G-CSF em modelo animal de CChC encorajam a sua avaliação terapêutica na doença de Chagas. Por fim, outros estudos devem ser realizados para que haja uma melhor compreensão dos efeitos desta citocina, tanto no parasito quanto no sistema imune do hospedeiro, visando um melhor uso do G-CSF na clínica para o tratamento de doenças crônicas.

5 CONCLUSÕES

- O tratamento por três ciclos de G-CSF em modelo experimental de CChC proporcionou modulação da resposta imune sistêmica com participação das células T regulatórias;
- A modulação da resposta imune-inflamatória dos animais nesse modelo proporcionou a melhora funcional dos animais tratados com G-CSF por três ciclos, sem proporcionar a reagudização da doença de Chagas, o que encoraja a sua utilização terapêutica nessa doença.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul; LICHTMAN, Andrew; PILAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 564 p.
- AGNELLO, Davide et al. Granulocyte colony-stimulating factor decreases tumor necrosis factor production in whole blood: role of interleukin-10 and prostaglandin E (2). *European Cytokine Network*, v. 15, p. 323–326. 2004.
- AKAHANI, Shiro et al. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer Research**, v. 1, n. 57, p. 5272-5276. 1997.
- ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**.4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- ANDERLINI, Paolo et al. Allogeneic blood progenitor cell collection in normal donors after mobilization with filgrastim: the M.D. Anderson Cancer Center experience. **Transfusion**, v. 39, p. 555-560. 1999.
- ANDERLINI, Paolo; CHAMPLIN, Richard. Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals: recent findings and current challenges. **Blood**, v. 111, n. 15, p. 1767-1772. 2008.
- ANDRADE, Sônia. Patologia experimental da doença de Chagas. **In Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Org: Z. Brener, Z.A. Andrade e M. Barral-Neto. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- ANDRADE, Zilton. Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. **Ciba Foundation Symposium**. v. 99, p. 214-233. 1983.
- AÑEZ, Nestor et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 5, p. 726–732. 1999.
- ARAÚJO, Aduino et al. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 9e16. 2009.
- ARPINATI, Mauro et al. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. **Blood**, v. 95, p. 2484–2490. 2000.
- ASSMUS, Birgit. et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation**, v. 10, n. 106(24), p. 3009-3017. 2002.
- BARRETO, Antônio Carlos et al. Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.79, n.4, p. 1-30. 2002.

- BAUMANN, Heinz ; GAULDIE, Jack. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, p. 74-80. 1994.
- BELKAID, Yasmine; BLANK, Rebecca; SUFFIA, Isabelle. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. **Immunology Reviews**, v. 212, p. 287–300. 2006.
- BENSON, Micah et al. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1765-1774. 2007.
- BENVENUTI, Luiz Alberto et al. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 102, n. 6, p. 481-487. 2008.
- BILATE, Angelina et al. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1104-1113. 2007.
- BILATE, Angelina; CUNHA-NETO, Edécio. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, n. 2, p. 67-74. 2008.
- BOBER, Loretta et al. The effects of colony stimulating factors on human monocyte cell function. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 17, n. 5, p. 385-392. 1995.
- BOCCHI, Edimar et al. Heart transplantation for chronic Chagas' heart disease. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 61, p. 1727-1733. 1996.
- BONEBERG, Eva Maria et al. Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. **Blood**, v. 1, n. 95(1), p. 270-276. 2000.
- BONNET, Dominique. Haematopoietic stem cells. **The Journal of Pathology**, v. 197, n. 4, p. 430-440. 2002.
- BORDA, Enri et al. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to f-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 57, p. 679-686. 1984.
- BRENER, Zigman ; GAZZINELLI, Ricardo. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, p. 103-110. 1997.
- BRENER, Zigman; ANDRADE, Zilton; BARRAL-NETTO, Manoel. **Trypanossoma cruzi e doença de Chagas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431p.

BRENER, Zigman; GAZZINELLI, Ricardo. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 114, p. 103–110. 1997.

BRITTO, Constança et al. Parasite Persistence in Treated Chagasic Patients Revealed by Xenodiagnosis and Polymerase Chain Reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96. 2001.

BUSCAGLIA, Carlos et al *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, p. 229-236. 2006.

CALDAS, Ivo et al. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitology Research*, v. 103, p. 413–421. 2008.

CAMPOS-DE-CARVALHO, Antônio Carlos et al. Conduction defects and arrhythmias in Chagas' disease: possible role of gap junctions and humoral mechanisms. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, v. 5, p. 686–698. 1994.

CANÇADO, J. Romeu. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 44, n. 1, p. 29-37. 2002.

CASE, Jamie et al. In vitro clonal analysis of murine pluripotent stem cells isolated from skeletal muscle and adipose stromal cells. *Experimental Hematology*, v. 36, n. 2, p. 224–234. 2008.

CASHEN, Amanda et al. Cytokines and stem cell mobilization for autologous and allogeneic transplantation. *Current Hematology Reports*, v. 3, n. 6, p. 406-412. 2004.

CHEN, Wanjun et al. Conversion of Peripheral CD4+ CD25- Naive T Cells to CD4+ CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *The Journal of Experimental medicine*, v. 198, n. 12, p. 1875-1886. 2003.

CORREA-OLIVEIRA, Rodrigo et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 253-255. 1999.

COSTA, Jane; LORENZO, Marcelo. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104(I), p. 46-51. 2009.

CUNHA-NETO, Edécio et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant

Trypanosoma cruzi antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 3541-3545. 1995.

CUNHA-NETO, Edécio et al. Autoimmunity in Chagas' Disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 8, p. 1709-1712. 1996.

DALE, David. Approach to hematologic disorders. **American College of Physicians Medicine**, P. 1-10. 2008.

da SILVA, Rosângela; GORDON, Siamon. Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein. **Biochemical Journal**, v. 15, n. 338, p. 687-694. 1999.

de ARAÚJO, Fernanda Fortes et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. e992. 2011.

de BOER, Rudolf; YU, Lili; VELDHUISEN, Dirk. Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. **Annals of Medicine**, v. 43, n. 1, p. 60-68. 2011.

de MEIS, Juliana et al. Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, p. e417. 2009.

DEB, Arjun et al. Bone Marrow-Derived Cardiomyocytes are Present in Adult Human heart A Study of Gender- mismatched Bone Marrow Transplantation Patients. **Circulation**, p. 2010-2011. 2003.

DEMETRI, George; GRIFFIN, James. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. **Blood**, v. 78, n. 11, p. 2791-2808. 1991.

DIAS, João Carlos Pinto; COURA, José Rodrigues. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 486p, 1997.

DIAS, João Carlos Pinto; DIAS, Emmanuel. **Doença de Chagas**. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Brasília: Ministério da Saúde. Sucam, 52p. 1989.

DOMEN, Jos; WAGERS, Amy; WEISSMAN, Irving. Bone marrow (hematopoietic) stem cells. **Regenerative medicine**, NIH, 2006.

DUTRA, Walderez et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 208-218. 2009.

DUTRA, Walderez; ROCHA, Manoel Otávio; TEIXEIRA, Mauro. The clinical immunology of human Chagas disease. **TRENDS in Parasitology**, v.21, n. 12, p. 581-587. 2005.

ESTANI, Sérgio; SEGURA, Leonor. Treatment of *Trypanosoma cruzi* Infection in the Undetermined Phase. Experience and Current Guidelines of Treatment in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94(I), p. 363-365. 1999.

FELDMANN, Marc. Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p. 3533-3536. 2008.

FIORELLI, Alfredo Inácio et al. Insuficiência cardíaca e transplante cardíaco. **Revista de Medicina**, v. 87, n. 2, p. 105-120. 2008.

FRANCO-PAREDES, Carlos; BOTTAZZI, Maria Elena; HOTEZ, Peter. The Unfinished Public Health Agenda of Chagas Disease in the Era of Globalization. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.3, n. 7, p. e470. 2009.

FRANZKE, Anke et al. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. **Blood**, v. 102, p. 734–739. 2003.

FRANZKE, Anke. The role of G-CSF in adaptive immunity. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, p. 235–244. 2006.

GARCIA, Eloi; GONZALEZ, Marcelo; AZAMBUJA, Patrícia. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 213-216. 1999.

GARCIA, Simone et al. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1521–1528. 2005.

GIRONÈS, Núria; FRESNO, Manuel. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **TRENDS in Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 2003.

GOLGHER, Denise; GAZZINELLI, Ricardo. Innate and Acquired Immunity in the Pathogenesis of Chagas Disease. **Autoimmunity**, v. 37, n. 5, p. 399-409. 2004.

GOMES, J. Anthony et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1185-1193. 2003.

GUIMARÃES, Elisalva. Isolamento, caracterização, diferenciação e uso terapêutico de células-tronco adultas obitadas da polpa dentária murina. 2010. 1v. 144f. Tese (Doutorado

em Patologia Experimental) – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

GUYTON, Arthur. Fisiologia Humana. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 576p.

HARADA, Mutsuo et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the jak-stat pathway in cardiomyocytes. **Nature Medicine**, v. 11, n. 3, p. 305-311. 2005.

HELD, Thomas; GUNDERT-REMY, Ursula. Pharmacodynamic effects of haematopoietic cytokines: the view of a clinical oncologist. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 3, p. 210-214. 2009.

HENDERSON, Neil; SETHI, Tariq. The regulation of inflammation by galectin-3. **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 160-171. 2009.

HERNANDEZ, Ciria Carolina et al. Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca²⁺ currents. **Cardiovascular Research**, v. 58, n. 1, p. 55-65. 2003.

HIGUCHI, Maria de Lurdes et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**, v. 60, p. 96-107. 2003.

HIGUCHI, Maria de Lurdes. Human Chronic Chagasic Cardiopathy: Participation of Parasite Antigens, Subsets of Lymphocytes, Cytokines and Microvascular Abnormalities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94(I), p. 263-267. 1999.

HIGUCHI, Yoshihiro et al. Tumor Necrosis Factor Receptors 1 and 2 Differentially Regulate Survival, Cardiac Dysfunction, and Remodeling in Transgenic Mice With Tumor Necrosis Factor- α -Induced Cardiomyopathy. **Circulation**, v. 109, p. 1892-1897. 2004.

HSIEH, Chyi-Song; LEE, Hyang-Mi; LIO, Chan-Wang. Selection of regulatory T cells in the thymus. **Nature Reviews Immunology**, v.12, p. 157-167. 2012.

HSU, Daniel et al. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 81, p. 519–526. 1999.

<http://www.isradiology.org>; <http://www.fiocruz.br/chagas>.

HÜTTMANN, Andreas et al. Granulocyte colony-stimulating factor induced blood stem cell mobilization in patients with chronic heart failure - Feasibility, safety and effects on exercise tolerance and cardiac function. **Basic Research in Cardiology**, v. 101, p. 78– 86. 2006.

JANEWAY, Charles et al. **Immunobiology - The Immune System in Health and Disease**.5.ed. New York: Garland Science, 2001. 928p.

JUN, Hyun et al. G-CSF improves murine G6PC3-deficient neutrophil function by modulating apoptosis and energy homeostasis. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3881-1892. 2011.

KARED, Hassen et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4+CD25+ regulatory T cells. **Diabetes**, v. 64.2005.

KAWAMOTO, Atsuhiko et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. **Circulation**, v. 103, p. 634–637. 2001.

KIERSZENBAUM, Felipe. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 37, p. 1-11. 2003.

KIROUAC, Daniel et al. Cell–cell interaction networks regulate blood stem and progenitor cell fate. **Molecular Systems Biology**, v. 293, n. 5, p. 1-20. 2009.

KLANGSINSIRIKUL, Phennapha; RUSSELL, Nigel. Peripheral blood stem cell harvests from G-CSF-stimulated donors contain a skewed Th2 CD4 phenotype and a predominance of type 2 dendritic cells. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 495–501. 2002.

KOCHER, Alfred et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nature Medicine**, v. 7, p. 430-436. 2001.

KORN, Thomas et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485-517. 2009.

KRAMPERA, Mauro et al. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. **Blood Transfusion**, v. 5, p. 120-129. 2007.

KRAUSE, Diane. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Gene Therapy**, v. 9, n. 11, p. 754-758. 2002.

KUHLMANN, Michael et al. G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 1, p. 87-97. 2006.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul; FAUSTO Nelson. Robbins & Cotran: Bases patológicas das doenças. 7.ed. Elsevier: 2005.

KUWABARA, Ichiro; LIU, Fu-Tong. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 1, p. 3939-3944. 1996.

KUWABARA, Masanori et al. Granulocyte colony-stimulating factor activates Wnt signal to sustain gap junction function through recruitment of beta-catenin and cadherin. **FEBS Letters**, v. 581, n. 25, p. 4821-4830. 2007.

- LERI, Annarosa; KAJSTURA, Jan; ANVERSA, Piero. Myocyte proliferation and ventricular remodeling. **Journal of Cardiac Failure**, v. 8, p. 518-525. 2002.
- LI, Ming; WAN, Yisong; FLAVELL, Richard. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. **Immunity**, v. 26, n. 5, p. 579-591. 2007.
- LIM, Young-Hyo et al. Effects of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) on diabetic cardiomyopathy in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. **Cardiovascular Diabetology**, v. 10, p. 92. 2011.
- LIU, Fu-Tong et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. **The American Journal of Pathology**, v. 147, n. 4, p. 1016-1028. 1995.
- LONGO, Beatriz et al. Distribution and proliferation of bone marrow cells in the brain after pilocarpine-induced status epilepticus in mice. **Epilepsia**, v. 51, n. 8, p. 1628-1632. 2010.
- MACAMBIRA, Simone Garcia et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 11, p. 3843-3850. 2009.
- MACIEL, Leonardo et al. Ventricular arrhythmias are related to the presence of autoantibodies with adrenergic activity in chronic chagasic patients with preserved left ventricular function. **Journal of Cardiac Failure**, v. 18, n. 5, p. 423-431. 2012.
- MAIANSKI, Nikolai et al. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. **Blood**, v. 99, n. 2, p. 672-679. 2002.
- MAIANSKI, Nikolai; ROOS, Dirk; KUIJPERS, Taco. Bid truncation, Bid/Bax targeting to the mitochondria, and caspase activation associated with neutrophil apoptosis are inhibited by granulocyte colony-stimulating factor. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 11, p. 7024-7030. 2004.
- MARINHO, Alexandre. Um estudo sobre as filas para internações e para transplantes no sistema único de saúde brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v.22, n. 10, p. 2229-2239. 2004.
- MARIN-NETO, José Antônio et al. Cardiopatía Chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 72, n. 3, p. 247-263. 1999.

MARIN-NETO, José Antônio et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104(I), p. 319-324. 2009.

MARUYAMA, Tetsuo et al. Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. **Reproduction**, v.140, p. 11–22. 2010.

MASET, Angelo; DUARTE, Kleber; GRECO, Osvaldo. O fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) para isquemia cerebral. Uma nova aplicação terapêutica? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 416-424. 2007.

MASUDA, Masako et al. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. **TheFASEB Journal**, v. 12, p. 1551-1555. 1998.

MATTIA, Ana Lúcia et al. Análise das dificuldades no processo de doação de órgãos: uma revisão integrativa da literatura. **Revista Bioethikas**, v. 4, n. 1, p. 66-74. 2010.

MAYA, Juan Diego et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biology Research**, v. 43, p. 323-331. 2010.

MIELCAREK, Marco et al. Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T cell proliferation. **Blood**, v. 92, p. 215–222. 1998.

MIENO, Shigetoshi et al. Role of stromal-derived factor-1alpha in the induction of circulating CD34+CXCR4+ progenitor cells after cardiac surgery. **Circulation**, v. 114, n. 1, p. 186-192. 2006.

MILBERG, Peter et al. G-CSF therapy reduces myocardial repolarization reserve in the presence of increased arteriogenesis, angiogenesis and connexin 43 expression in an experimental model of pacing-induced heart failure. **Basic Research in Cardiology**, v. 106, n. 6, p. 995-1008. 2011.

MINATOBUCHI, Shynia et al. Acceleration of the Healing Process and Myocardial Regeneration May Be Important as a Mechanism of Improvement of Cardiac Function and Remodeling by Postinfarction Granulocyte Colony–Stimulating Factor Treatment. **Circulation**, v. 109, p. 2572-2580. 2004.

MONCAYO, Álvaro. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p. 577–591. 2003.

MORRIS, Edward et al. Donor treatment with pegylated G-CSF augments the generation of IL-10-producing regulatory T cells and promotes transplantation tolerance. **Blood**, v. 103, n. 9, p. 3573-3581. 2004.

MORRIS, Stephen et al. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. **Circulation**, v. 82, p. 1900-1909. 1990.

NAWA, Yuichiro et al. G-CSF reduces IFN-gamma and IL-4 production by T cells after allogeneic stimulation by indirectly modulating monocyte function. **Bone Marrow Transplant**, v. 25, p. 1035–1040. 2000.

OH-EDA, Masayoshi et al. O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 15, n. 20, p. 11432-11435. 1990.

OLIVARES- FONTT, Elisabeth et al Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 6, p. 2722-2727. 1998.

OLIVEIRA, Sheilla Andrade et al. Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. **Cytotherapy**, v. 14, n. 3, p. 339-349. 2011.

ORLIC, Donald et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, p. 701-705. 2001a.

ORLIC, Donald et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 10344-10349. 2001b.

ORLIC, Donald The strength of plasticity: stem cells for cardiac repair. **International Journal of Cardiology**, v. 95, n. 1, p. 16-19. 2004.

PAN, Luying et al. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. **Blood**, v. 86, p. 4422–4429. 1995.

PARKER, Eva; SETHI, Aisha. Chagas Disease: Coming to a Place Near You. **Dermatologic Clinics**, v. 29, p. 53–62. 2011.

PARSLOW, Tristram et al. **Imunologia Médica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 684 p.

PITTINGER, Mark et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147. 1999.

PORTH, Carol Mattson. **Fisiopatologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1451 p.

- POULSOM, Richard. Adult stem cell plasticity. **The Journal of Pathology**, v. 197, n. 4, p. 441-456. 2002.
- PRATA, Aluizio. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v.1, n. 2, p. 92-100. 2001.
- PUNUKOLLU, Gopikrishna et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 115, p. 279–283. 2007.
- QUAINI, Federico et al. Chimerism of the transplanted heart. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 5-15. 2002.
- RASSI, Anis Jr; RASSI, Anis; RASSI, Sérgio. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1101-1108. 2007.
- RASSI, Anis; RASSI, Sérgio; RASSI, Anis. Sudden death in Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 76, n. 1, p. 75-96. 2001.
- READ, Simon; MALMSTROM, Vivianne; POWRIE, Fiona. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v.192, n. 2, p. 295–302. 2000.
- REED, Steven et al. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 7, p. 3135-3140. 1994.
- REYES, E. et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) transiently suppresses mitogen-stimulated T-cell proliferative response. **British Journal of Cancer**, v. 80, p. 229–235. 1999.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, Ricardo et al. Cell therapy in Chagas cardiomyopathy (Chagas Arm of the Multicenter Randomized Trial of Cell Therapy in Cardiopathies Study): A Multicenter Randomized Trial. **Circulation**, v. 125, n. 20, p. 2454-2461. 2012.
- RIZZO, Luís Vicente, CUNHA-NETO, Edécio; TEIXEIRA, Antonio. Autoimmunity in Chagas' Disease: Specific Inhibition of Reactivity of CD4+ T Cells against Myosin in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 9, p. 2640-2644. 1989.
- ROBINSON, Stephen Paul et al. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. **The European Journal of Immunology**, v. 29, n. 9, p. 2769-2778. 1999.
- ROCHA, Nazaré et al. Characterization of cardiopulmonary function and cardiac muscarinic and adrenergic receptor density adaptation in C57BL/6 mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology**, v.133, n. 6, p. 729–737. 2006.

RONCAROLO, Maria Grazia et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunological Reviews**, v. 212, p. 28-50. 2006.

ROTA, Marcello et al. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 45, p. 17783–17788. 2007.

RUTELLA, Sérgio et al. Granulocyte colony-stimulating factor perturbs lymphocyte mitochondria function and inhibits cell cycle progression. **Experimental Hematology**, v. 28, p. 12–25. 2000.

RUTELLA, Sérgio et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN- α . **The European Journal of Immunology**, v. 34, n. 5, p. 1291-1302. 2004.

RUTELLA, Sérgio et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor: A Novel Mediator of T Cell Tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 7085–7091. 2005.

RUTELLA, Sérgio et al. Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells. **Blood**, v.100, p. :2562–2571. 2002.

RUTELLA, Sérgio et al. Serum of healthy donors receiving recombinant human granulocyte colony-stimulating factor induces T cell unresponsiveness. **Experimental Hematology**, v. 26, p. 1024–1033. 1998.

RUTELLA, Sérgio et al. T-cell apoptosis induced by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is associated with retinoblastoma protein phosphorylation and reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. **Experimental Hematology**, v. 29, p. 401-415. 2001.

RUTELLA, Sérgio; LEMONI, Roberto. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. **Immunology Letters**, v. 94, p. 11-26. 2004.

SAKAGUCHI, Shimon et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **The Journal of Immunology**, v. 155, p. 1151–1164. 1995.

SAKAGUCHI, Shimon. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunology**, v. 6, n. 4, p. 345-352. 2005.

SAKAGUCHI, Shimon. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self tolerance. **Cell**, v. 101, p. 455–458. 2000.

SHIMOJI, Kenichiro et al. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 3, p. 227-237. 2010.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo et al. Chagas disease and deep ecology: the anti-vectorial fight in question. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 2, p. 677-687. 2011.

SLOAND, Elaine et al. Pharmacologic doses of granulocyte colony stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. **Blood**, v. 95, p. 2269–2274. 2000.

SOARES, Milena Botelho et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. **The Journal of Infectious Disease**, v. 202, n. 3, p. 416-426. 2010.

SOARES, Milena Botelho et al. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. **The American Journal of Pathology**, v. 159, p. 703-709. 2001a.

SOARES, Milena Botelho et al. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. **Cell Cycle**, v. 10, n. 9, p. 1448-1455. 2011.

SOARES, Milena Botelho et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 2, p. 441-447. 2004.

SOARES, Milena Botelho; PONTES-DE CARVALHO, Lain; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Ricardo. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 4, p. 547-559. 2001b.

SOJKA, Dorothy; HUANG, Yu-Hui; FOWELL, Deborah. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124, p. 13-22. 2008.

SOLAROGLU, Ihsan et al. Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. **Neuroscience**, v. 143, n. 4, p. 965-974. 2006.

SOSA-ESTANI, Sérgio; SEGURA, Elsa Leonor. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the indeterminate phase: experience and current guidelines in Argentina. **Medicina**, v. 59, n. 2, p. 166-170. 1999.

SOUZA, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. Organizadores: Brener, Z; Andrade Z e Barral-Netto, M. 2.ed. Guanabara Koogan. 2000.

STEELE, Ann et al. Stem-like cells traffic from heart ex vivo, expand in vitro, and can be transplanted in vivo. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 24, n. 11, p. 1930-1939. 2005.

STERIN-BORDA, Leonor. Alloimmune IgG binds and modulates cardiac beta-adrenoceptor activity. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 58, n. 1, p. 223-228. 1984.

STERIN-BORDA, Leonor; GORELIK, Gabriela; BORDA, Enri. Chagasic IgG binding with cardiac muscarinic cholinergic receptors modifies cholinergic-mediated cellular transmembrane signals. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 61, n. 3, p. 387-397. 1991.

SUGANO, Yasuo et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, v. 65, n. 2, p. 446-456. 2005.

TAKANO, Hiroyuki et al. G-CSF therapy for acute myocardial infarction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 10, p. 512-517. 2007.

TARLETON, Rick et al. The Challenges of Chagas Disease— Grim Outlook or Glimmer of Hope? **PLOS Medicine**, v.4, n. 12, p. 1852-1857. 2007.

TEIXEIRA, Mauro; GAZZINELLI, Ricardo; SILVA, João. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 6, p. 262-265. 2002.

THOMAS, Peter; BECK-WERTERMEYER, Melissa. Preclinical approaches for safety assessment of cytokines. **In Cytokines in human health: Immunotoxicology, Pathology, and Therapeutic applications**. Org: House, Robert, Descotes, Jacques. 2.ed. Totowa: Humana press, 2007.

THOMSON, James et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147. 1998.

TOH, Han et al. G-CSF induces a potentially tolerant gene and immunophenotype profile in T cells in vivo. **Clinical Immunology**, v. 132, n. 1, p. 83-92. 2009.

TOMA, Catalin et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation**, v. 105, p. 93-98. 2002.

TROSSINI, Gustavo. **Antichagásicos potenciais: síntese de bases de Mannich do hidroximetilnitrofuril**. 2004. 1v. 130f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VILAS-BOAS, Fábio et al. Bone marrow cell transplantation in Chagas' disease heart failure: report of the first human experience. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 4, p. 325-331. 2011.

VILAS-BOAS, Fábio et al. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 2, p. 159-166. 2006.

VILAS-BOAS, Fábio et al. Transplante de Células de Medula Óssea para o Miocárdio em Paciente com Insuficiência Cardíaca Secundária à Doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 82, n. 2, p. 181-184. 2004.

VITELLI-AVELAR, Danielle et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD 4+ CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, p. 81-92. 2006.

VLAD, George; CORTESINI, Raffaello; SUCIU-FOCA, Nicole. License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. **The Journal of Immunology**, v. 15, n. 74, p. 5907-5914. 2005.

WAGHABI, Mariana et al. Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor-beta treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1083-1090. 2009.

WANG, Jih-Shiuan et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 120, p. 999-1006. 2000.

WANG, Jih-Shiuan et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 122, n. 4, p. 699-705. 2001.

WATT, Suzanne et al. Functionally defined CD164 epitopes are expressed on CD34(+) cells throughout ontogeny but display distinct distribution patterns in adult hematopoietic and non hematopoietic tissues. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3113-3124. 2000.

WHO – World Health Organization. *Chagas disease*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em: 04 de março de 2012.

WILSON, Amanda; BUTLER, Peter; SEIFALIAN, Alexander. Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review. **Cell Proliferation**, v. 44, n. 1, p. 86-98. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 905, v. 109, 2002.

XIAO, Bao-Guo; LU, Chuan-Zhen; LINK, Hans. Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1272-1290. 2007.

XU, Lili et al. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 6725-6729. 2007.

ZOU, Linhua et al. Bone marrow is a reservoir for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. **Cancer Research**, v. 64, n. 22, p. 8451-8455. 2004.