



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**TESE DE DOUTORADO**

**CÉLULAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA NO REPARO DE LESÕES  
CAUSADAS POR INFECÇÕES PARASITÁRIAS EM CAMUNDONGOS  
QUIMÉRICOS.**

**CARINE MACHADO AZEVEDO**

**Salvador – Brasil**

**2013**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**TESE DE DOUTORADO**

**CÉLULAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA NO REPARO DE LESÕES  
CAUSADAS POR INFECÇÕES PARASITÁRIAS EM CAMUNDONGOS  
QUIMÉRICOS.**

**CARINE MACHADO AZEVEDO**

Orientador: Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos

Co-orientadora: Dra. Milena B. P. Soares

Tese apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa para a obtenção do  
grau de Doutor.

**Salvador – Brasil**

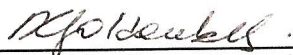
**2013**

“CÉLULAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA NO REPARO DE LESÕES CAUSADAS POR  
INFECÇÕES PARASITÁRIAS EM CAMUNDONGOS QUIMÉRICOS”

**CARINE MACHADO AZEVEDO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr<sup>a</sup> Regina Coeli dos Santos Goldemberg  
Professora Associada  
UFRJ



---

Dr. Luiz Fernando Quintanilha de Mesquita  
Pesquisador  
CBTC/HSR



---

Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

Aos meus pais David Ferreira Azevedo (I.M.) e Maria Machado Azevedo  
por todo amor, dedicação, incentivo  
e apoio para que eu pudesse realizar meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Aos orientadores Dr. Ricardo Ribeiro e Dra. Milena Soares pela oportunidade e conhecimentos transmitidos;

À Bruno Solano e Sheilla Andrade pela contribuição indispensável em todas as etapas do trabalho, pelo estímulo e amizade;

À Ricardo S. de Lima pela contribuição e apoio fundamentais para a realização deste trabalho e pelos momentos de descontração;

À Geraldo Pedral Sampaio e Liliane Monteiro Cunha pela ajuda na realização da citometria de fluxo;

À Carla Kaneto, Ana Luiza Angelo, Daniela Nascimento e Gabriela Cruz pela contribuição na realização dos PCRs;

À Juliana F. Senra Vasconcelos pela colaboração na morfometria;

À Cristina Aragão S. Ferrari pela ajuda indispensável na eutanásia dos animais e coleta de material e pela disponibilidade em ajudar sempre;

À Isabela Ichihara e Patrícia Nascimento pela colaboração em diferentes etapas do trabalho;

Às técnicas Edlucia Santos e Roseane Barreto pelo apoio e amizade;

Ao amigo Antonio Carlos da Silva Santos e ao Dr. Zilton Andrade, do Laboratório de Patologia Experimental, por fornecerem as cercárias utilizadas para infecção dos animais;

À Diogo Rodrigo Moreira e Kyan Aladhadi pela revisão e sugestões nos artigos;

Aos queridos Gisele B. Carvalho, Daniela Nascimento, Marcos Maurício T. Leal, Adriano Alcântara, Gabriela Cruz, Cássio Santana e todos os outros colegas do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular e Laboratório de Engenharia Tecidual por toda ajuda prestada durante a realização deste trabalho;

Às agências de fomento FAPESB, FINEP e CNPq pelo apoio financeiro e à FIOCRUZ;

À minha família e meu marido por todo carinho, compreensão e incentivo imprescindíveis para a realização deste trabalho;

À Deus, meu protetor e guia, pela graça alcançada.

“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham,  
ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”

Leonardo da Vinci

AZEVEDO, Carine Machado. CÉLULAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA NO REPARO DE LESÕES CAUSADAS POR INFECÇÕES PARASITÁRIAS EM CAMUNDONGOS QUIMÉRICOS. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

## RESUMO

A contribuição das células de medula óssea na regeneração de tecidos não hematopoiéticos tem sido intensamente investigada desde a descoberta de células-tronco multipotentes neste órgão. Estudos prévios tem demonstrado que células derivadas da medula óssea podem contribuir para a formação de novos hepatócitos e cardiomiócitos. No presente estudo avaliamos a participação endógena das células-tronco de medula óssea no processo de reparo de lesões teciduais na fase crônica da doença de Chagas e esquistossomose experimentalmente induzidas. Para isso, camundongos quiméricos de medula óssea foram gerados após irradiação com dose letal e posterior reconstituição com células de medula óssea provenientes de camundongos transgênicos para a proteína fluorescente verde (GFP). Um mês após a reconstituição, as quimeras foram infectadas pelo *T. cruzi* ou *S. mansoni*. Animais quiméricos saudáveis foram mantidos como controles. Camundongos foram eutanasiados em diferentes períodos para análise morfológica, morfométrica e de marcadores específicos através de imunofluorescência do coração e músculo esquelético ou fígado de acordo com o grupo. As infecções por *S. mansoni* e *T. cruzi* causaram a mobilização de diferentes populações celulares para o sangue periférico, tais como monócitos, células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais e progenitores endoteliais. Nos dois modelos estudados, observamos um aumento no número de células GFP<sup>+</sup> após estímulo lesivo nos tecidos analisados. No modelo de doença de Chagas, há um aumento da expressão de MCP-1, 2 e 3 e SDF-1 no coração e músculo esquelético em comparação com animais não infectados, o que pode contribuir para o recrutamento destas células. As células GFP<sup>+</sup> contribuem tanto para a formação da lesão, compondo o infiltrado inflamatório, como para a regeneração tecidual através da formação de miofibras, cardiomiócitos, hepatócitos e vasos sanguíneos. As poucas células GFP<sup>+</sup> encontradas nos tecidos de camundongos quimeras normais não possuíam morfologia de células parenquimatosas. Concluímos que a medula óssea pode contribuir para a regeneração dos tecidos lesados através de células-tronco ou progenitores que originam células dos músculos cardíaco e esquelético, hepatócitos e vasos sanguíneos.

Palavras-chave: doença de Chagas, esquistossomose, camundongos quiméricos, células-tronco, reparo tecidual.

AZEVEDO, Carine Machado. **BONE MARROW DERIVED CELLS IN THE REPAIR OF INJURIES CAUSED BY PARASITIC INFECTIONS IN CHIMERIC MICE.** Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

### ABSTRACT

The contribution of bone marrow cells in non-hematopoietic tissue regeneration has been intensely investigated since the discovery of multipotent stem cells in this organ. Previous studies have shown that bone marrow derived cells may contribute to the formation of new hepatocytes and cardiomyocytes. In the present study, we evaluated the participation of endogenous bone marrow stem cells in the repair of tissue injury in experimentally induced chronic phases of Chagas disease and schistosomiasis. For this purpose, chimeric mice were generated from bone marrow after a lethal irradiation dose and subsequent reconstitution with bone marrow cells from green fluorescent protein (GFP) transgenic mice. A month after reconstitution, chimeras were either infected with *Trypanosoma cruzi* or *Schistosoma mansoni*, or kept healthy as controls. Mice were euthanized at different time points for histological, morphometric and specific markers by immunofluorescence analysis in heart and skeletal muscle or in the liver, according to the group. Infections caused by *S. mansoni* and *T. cruzi* resulted in the mobilization of different cell populations to the peripheral blood, including monocytes, hematopoietic and mesenchymal stem cells, and endothelial progenitors. In the two models studied, we observed an increase in the number of GFP<sup>+</sup> cells after injury stimulus in the tissues analyzed. In the model of Chagas disease, there is an increased expression of MCP-1, 2, 3 and SDF-1 in heart and skeletal muscle compared to uninfected animals, which can contribute to the recruitment of these cells. The GFP<sup>+</sup> cells both contribute to lesion formation, comprised of inflammatory infiltrate, as well as tissue regeneration by forming myofibers, cardiomyocytes, hepatocytes and blood vessels. The few GFP<sup>+</sup> cells found in control chimera mice tissue lacked parenchymal cell morphology. We concluded that bone marrow may contribute to the regeneration of injured tissues through stem or progenitor cells, which gives rise cardiac and skeletal muscle cells, hepatocytes and blood vessels.

Key words: Chagas disease, schistosomiasis, chimeric mice, stem cells, tissue repair.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Possíveis fontes de células-tronco no reparo tecidual.....  | 18 |
| Figura 2: Modelos experimentais para rastreamento de células derivadas da medula óssea (modificado de FORBES et al., 2002)..... | 29 |

### MANUSCRITO I

|   |    |
|---|----|
| Table 1. Acute infection with <i>T. cruzi</i> induces the mobilization of Sca-1 <sup>+</sup> and monocytes to the peripheral blood..... | 48 |
| Figure 1: Gene expression of chemokines in the heart and skeletal muscle.....   | 51 |
| Figure 2: Generation of GFP <sup>+</sup> bone marrow chimeric mice .....  | 52 |
| Figure 3: Infection of bone marrow chimeric mice with <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 53 |
| Figure 4: Presence of GFP <sup>+</sup> cells in the hearts of chagasic chimeric mice.....   | 54 |
| Figure 5: Presence of GFP <sup>+</sup> cells in skeletal muscle of chagasic chimeric mice.....  | 55 |
| Figure 6: Characterization of GFP <sup>+</sup> cells in different organs of <i>T. cruzi</i> -infected chimeric mice.....                | 56 |
| Figure 7: Expression of IGF-1 and VEGF in the heart and skeletal muscle.....  | 57 |

### MANUSCRITO II

|  |    |
|--|----|
| Table 1. Chronic infection with <i>S. mansoni</i> induces the mobilization of MSC and EPC to the peripheral blood..... | 72 |
| Figure 1: A schematic illustration of the experimental design.....   | 74 |
| Figure 2: Chronic infection histological patterns of chimeric mice .....   | 75 |
| Figure 3: Migration of GFP <sup>+</sup> cells to the liver of infected mice.....                                       | 76 |
| Figure 4: Distribution of bone marrow-derived cells in liver of infected chimeric mice.....                            | 77 |

Figure 5: Presence of different cell types involved in liver injury and tissue repair derived from bone marrow cells. ....78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |   |
|------------------|---|
| CCl <sub>4</sub> | Tetracloroeto de carbono                                  |
| cDNA             | Ácido desoxirribonucleico complementar                    |
| DAPI             | 4,6-diamidino-2-phenylindole                              |
| EPC              | Célula progenitora endotelial                             |
| Fah              | Enzima fumaril acetoacetato hidrolase                     |
| FGF              | Fator de crescimento de fibroblasto                       |
| αFP              | Alfa fetoproteína   |
| GFAP             | Proteína glial fibrilar ácida                             |
| GFP              | Proteína verde fluorescente                               |
| HLA              | Antígeno de leucócito humano                              |
| HNF              | Fator nuclear hepático                                    |
| HSC              | Célula-tronco hematopoiética                              |
| IGF-1            | Fator de crescimento semelhante à insulina-1              |
| LLC-MK2          | Células epiteliais do rim de macaca mulata                |
| MCP-1            | Proteína quimioatratora de monócitos                      |
| MEC              | Matriz extracelular                                       |
| MSC              | Célula-tronco mesenquimal                                 |
| MMP9             | Metaloproteinase-9  |
| PBS              | Salina tamponada  |
| PCNA             | Antígeno nuclear de célula em proliferação                |
| PDGF             | Fator de crescimento derivado de plaquetas                |
| qRT-PCR          | Reação de polimerase em cadeia quantitativo em tempo real |
| RNA              | Ácido ribonucleico  |
| Sca-1            | Antígeno de célula-tronco                                 |
| SDF-1            | Fator derivado do estroma-1                               |
| αSMA             | Alfa actina de músculo liso                               |
| TGF-β            | Fator de crescimento transformador beta                   |
| TIMP1            | Inibidor tecidual de metaloproteinase-1                   |

|             |  |
|-------------|--|
| TNF         | Fator de necrose tumoral                               |
| VE-caderina | Caderina vascular endotelial                           |
| VEGF        | Fator de crescimento endotelial vascular               |
| VEGFR1      | Receptor para fator de crescimento endotelial vascular |
| VWF         | Fator de von Willebrand                                |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1.0 INTRODUÇÃO.....   | 14 |
| 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                              | 16 |
| 2.1 REPARO TECIDUAL.....                                    | 16 |
| 2.2 REPARO TECIDUAL E CÉLULAS-TRONCO.....                   | 17 |
| 2.3 REPARO TECIDUAL E CÉLULAS-TRONCO DE MEDULA ÓSSEA.....   | 18 |
| 2.3.1 Células-tronco hematopoiéticas (HSC).....             | 19 |
| 2.3.2 Células-tronco mesenquimais (MSC).....                | 20 |
| 2.3.3 Monócitos.....  | 22 |
| 2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO TECIDUAL.....            | 23 |
| 2.4.1 LESÃO DE MÚSCULO CARDÍACO E ESQUELÉTICO.....          | 23 |
| 2.4.2 DOENÇA DE CHAGAS E TERAPIA CELULAR.....               | 25 |
| 2.4.3 LESÃO HEPÁTICA.....                                   | 25 |
| 2.4.4 LESÃO HEPÁTICA E TERAPIA CELULAR.....                 | 28 |
| 2.5 ANIMAIS QUIMÉRICOS COMO FERRAMENTA DE INVESTIGAÇÃO..... | 28 |
| 2.6 FATORES DE RECRUTAMENTO.....                            | 30 |
| 3.0 OBJETIVO GERAL.....                                     | 31 |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                              | 31 |
| 4.0 MANUSCRITO I.....                                       | 32 |
| 5.0 MANUSCRITO II.....                                      | 58 |
| 6.0 DISCUSSÃO.....  | 79 |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 7.0 CONCLUSÕES.....                 | 86 |
| 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 87 |
| 9.0 ANEXOS.....                     | 97 |

## 1.0 INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa é uma atividade que aplica os princípios da engenharia e das ciências da saúde para a obtenção de substitutos biológicos que mantenham, melhorem ou restaurem as funções de órgãos e tecidos do corpo humano (ANVISA, 2007). Nesse contexto, de substituir ou melhorar o funcionamento dos tecidos lesados, as células-tronco surgiram com uma alternativa para o tratamento de doenças crônicas degenerativas.

Durante muito tempo perdurou a ideia que as células-tronco eram capazes de se diferenciar apenas em células específicas de determinada linhagem. Com a descoberta da plasticidade das células-tronco, percebeu-se que estas células podem originar linhagens diferentes da sua origem (KORBLING; ESTROV; CHAMPLIN, 2003). Assim, as células-tronco de medula óssea (células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais) podem participar naturalmente do processo de reparo tecidual como uma fonte geradora de células tecido-específicas em substituição às células perdidas durante uma lesão. Dessa forma, podem auxiliar a população de células-tronco teciduais presente em diversos tecidos (por exemplo, células satélites – músculo esquelético, células ovais – fígado, células-tronco cardíacas - coração)

Dentre as fontes de obtenção das células-tronco adultas, a medula óssea apresenta as vantagens de fácil obtenção e de já estar sendo utilizada na prática clínica há mais de 40 anos. Além disso, tem menores implicações ético-legais como ocorre com as células-tronco embrionárias. Diversos estudos tem demonstrado que as células-tronco de medula óssea podem participar da regeneração de diferentes tecidos, como músculo esquelético (FERRARI, 1998), fígado (ALISON et al., 2000) e coração (ORLIC et al., 2001), dentre outros.

Para que as células-tronco possam ser utilizadas de forma eficiente e segura, um longo caminho deve ser percorrido a fim de entender as propriedades dos diferentes tipos de células-tronco existentes, como estas células interagem com as outras células presentes nos tecidos e com o microambiente, os mecanismos envolvidos no processo de regeneração, em qual momento estas células atuam, dentre outras questões.

Os modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* são ferramentas importantes para elucidar tais questionamentos. Dentre estes modelos, a doença de Chagas e a esquistossomose são doenças parasitárias que provocam lesões persistentes em órgãos específicos como coração/músculo esquelético e fígado, respectivamente, servindo como modelos de estudo

para os processos de reparo que ocorre nestes órgãos. Nosso grupo demonstrou previamente que o transplante de células mononucleares de medula óssea contribui para a reparo tecidual na fase crônica da doença de Chagas (SOARES et.al., 2004), e esquistossomose (OLIVEIRA et al., 2008) através da redução de inflamação e fibrose. No entanto, ainda não se conhece como estas células naturalmente participam na formação e regeneração das lesões crônicas observadas nestes modelos experimentais de doenças parasitárias. No presente projeto foi investigada a contribuição das células de medula óssea na regeneração tecidual pós-infecção pelo *Trypanosoma cruzi* ou pelo *Schistosoma mansoni*, através da utilização de camundongos quiméricos de medula óssea.



## 2.0 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 REPARO TECIDUAL

O processo de reparo, que se inicia após a lesão de células e tecidos é fundamental para a sobrevivência do organismo. De um modo geral, pode ocorrer por regeneração ou cicatrização. Na regeneração células específicas (parenquimatosas) do tecido proliferam e reconstituem a massa celular perdida, já na cicatrização ocorre frequentemente uma combinação de regeneração e formação de cicatriz. O processo de cicatrização predomina quando há destruição da matriz extracelular (MEC) e inflamação crônica, que favorecem a deposição de colágeno e formação de fibrose, modificando a arquitetura do tecido. A ocorrência de um ou outro processo depende da habilidade do tecido em regenerar, da extensão da lesão e do tempo de estímulo envolvido (ROBINS E COTRAN, 2010).

Estímulos lesivos persistentes, tais como vírus, bactérias, organismos parasitários e agentes tóxicos, promovem um processo de inflamação crônica com participação de células mononucleares como macrófagos e linfócitos. Apesar da importância destas células para a eliminação dos agentes nocivos, elas também contribuem para a destruição tecidual. Como consequência ocorre cicatrização por substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo (fibrose). A formação da fibrose se dá pela deposição de colágeno pelos fibroblastos, cuja migração e proliferação são estimuladas por fatores de crescimento e citocinas (TGF- $\beta$ , PDGF, FGF e TNF) produzidos por plaquetas, células presentes no infiltrado inflamatório (principalmente macrófagos) e endotélio ativado (ROBINS E COTRAN, 2010).

No fígado, a fibrose ocorre em quase todos os casos de lesão crônica e está envolvida em diversas complicações presentes no estágio final da doença hepática, como hipertensão portal, ascite, disfunção metabólica, entre outras (FRIEDMAN, 2008). A identificação dos tipos celulares envolvidos na fibrose é importante para o desenvolvimento de terapias antifibrogênicas. As células estreladas hepáticas são as principais células envolvidas na fibrose hepática, embora outros tipos celulares como fibroblastos portais e células da medula óssea também participem do processo (HINZ et al., 2007; FRIEDMAN, 2008; LEMOINNE et al., 2013).

No coração, a fibrose é promovida pelos fibroblastos cardíacos e tem consequências desastrosas para o funcionamento do órgão como disfunção sistólica e diastólica, já que estas células não contribuem para a contração muscular. Além disso, compromete também a

transmissão elétrica entre os cardiomiócitos devido à separação dos mesmos pela MEC e fibroblastos (SCHNEE; HSUEH, 2000).

O fato é que quando ocorre fibrose, o tecido funcional é substituído por colágeno, o que compromete a função do órgão. Neste caso, o transplante de órgãos tem sido utilizado como a alternativa, uma vez que ainda não há terapia eficiente para a fibrose. No entanto, esta prática envolve vários problemas como baixa disponibilidade de doadores, necessidade de imunossupressão durante toda a vida do paciente e riscos do procedimento. Dessa forma, a busca de novas terapias se faz necessária com o intuito de promover um tratamento mais eficiente.

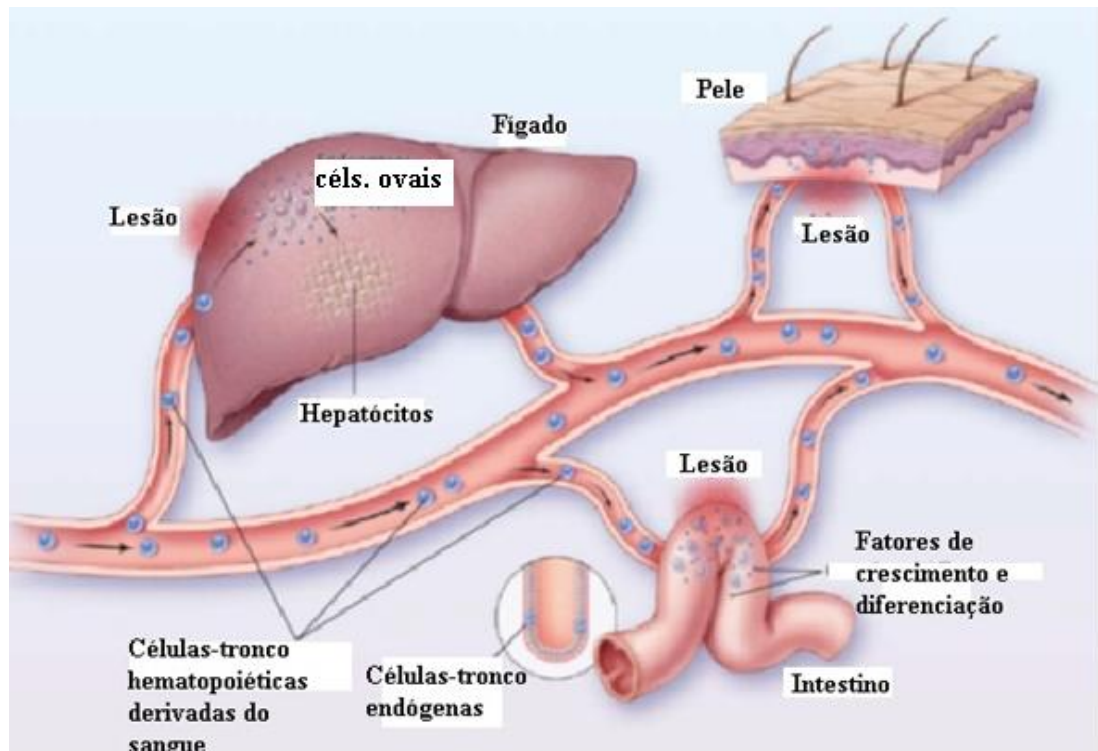
## 2.2 REPARO TECIDUAL E CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco participam naturalmente da homeostase tecidual, uma vez que o nicho de células-tronco presente em cada tecido pode alimentar o balanço entre morte celular por apoptose, proliferação e diferenciação celular. A capacidade regenerativa varia nos diferentes tecidos que compõem o organismo. Nos tecidos lábeis, como os hematopoiéticos, os epitélios do trato gastrointestinal e a epiderme, as células adultas são continuamente renovadas pela proliferação e diferenciação de células-tronco adultas (ROBINS E COTRAN, 2010).

No caso dos tecidos estáveis ou quiescentes, como fígado e rim, as células são mais estáveis e permanecem quiescentes até que ocorra um estímulo para proliferação. No fígado, por exemplo, ocorre preferencialmente a proliferação de hepatócitos e a população de células-tronco (chamadas células progenitoras em humanos e ovais em roedores) funcionam como compartimento reserva, sendo ativadas somente quando a proliferação de hepatócitos for lenta ou bloqueada. Por último, existem tecidos considerados permanentes, com baixa capacidade de regeneração como os músculos cardíaco e esquelético e o tecido nervoso, nos quais a regeneração ocorre através da proliferação e diferenciação de células-tronco presentes nesses tecidos (células-tronco cardíacas, células satélite e células-tronco neurais, respectivamente) (ROBINS E COTRAN, 2010).

Entretanto, quando a população de células-tronco teciduais é exaurida, devido a uma grande demanda como no caso de lesão tecidual, as células-tronco de medula óssea são recrutadas para participar do processo de reparo tecidual, como representado na figura 1 (KORBLING; ESTROV, 2003). Uma das evidências para isso foi encontrada por LaBarge e

Blau (2002) ao verificar um aumento de 20 vezes (3,52% X 0,16%) na frequência de miofibras derivadas da medula em camundongos submetidos a lesão por excesso de exercício físico comparados a animais sem lesão.



**Figura 1: Possíveis fontes de células-tronco no reparo tecidual.** As células-tronco teciduais substituem as células perdidas durante a lesão. Porém, quando esta população não é suficiente para suprir a demanda, células-tronco derivadas de medula óssea são recrutadas para a lesão (Fonte: KORBLING; ESTROV, 2003).

### 2.3 REPARO TECIDUAL E CÉLULAS-TRONCO DE MEDULA ÓSSEA

Neste contexto, as células-tronco surgiram como uma alternativa potencial para o tratamento de doenças crônicas e/ou degenerativas devido a sua capacidade de gerar células de diferentes linhagens celulares e a conhecida participação destas células nos processos de reparo tecidual. Na medula óssea encontram-se duas populações distintas de células-tronco: hematopoiéticas (responsáveis pela renovação do tecido sanguíneo) e mesenquimais (fazem parte do estroma) (KRAUSE 2002).

#### 2.3.1 Células-tronco hematopoiéticas (HSC)

As células-tronco hematopoiéticas são estudadas há mais tempo e provavelmente são as mais bem caracterizadas. Durante muito tempo, as células-tronco hematopoiéticas foram vistas como um sistema organizado e hierárquico composto por células com capacidade de auto-renovação e capaz de gerar células progenitoras (linfoide e mielóide) e células precursoras que originavam células terminalmente diferenciadas restritas a uma determinada linhagem (revisto por WEISSMAN, 2000). No entanto, este paradigma clássico de diferenciação restrita a uma linhagem órgão-específica foi substituído pela ideia de que células-tronco adultas mantêm uma certa plasticidade evolutiva que permite a transdiferenciação, ou seja, diferenciação em linhagens diferentes da sua origem (ANDERSON; GAGE; WEISSMAN, 2001; KORBLING; ESTROV, 2003). Alguns trabalhos sugerem que células da medula óssea podem originar células hepáticas (ALISON et al, 2000), células do músculo esquelético (FERRARI, 1998) e cardíaco (ORLIC et al., 2001). Porém o processo de transdiferenciação não foi criteriosamente demonstrado e com isso a possibilidade de fusão (quando células-tronco se fundem com as células do tecido lesionado e passam a expressar proteínas específicas das células com as quais se fundiram) não está descartada. Alguns critérios para demonstrar a plasticidade das células-tronco adultas devem ser observados: a origem exógena da célula integrada ao tecido deve ser demonstrada através de marcadores (como GFP, beta galactosidase ou cromossomo Y), as células devem ser processadas com um mínimo de manipulação *ex vivo*, as células transdiferenciadas devem ter fenótipo morfológico e molecular do tecido alvo e ser funcionalmente ativa (ANDERSON; GAGE; WEISSMAN, 2001; KORBLING; ESTROV; CHAMPLIN, 2003; KANJI; POMPILI; DAS, 2011).

Na literatura, os estudos realizados para demonstrar a plasticidade das células-tronco hematopoiéticas mostram resultados algumas vezes controversos. Wagers et al. (2002), utilizaram animais quiméricos sem lesão transplantados com uma única célula hematopoiética  $GFP^{+}c\text{-kit}^{+}Thy1.1^{lo}Lin^{-}Sca-1^{+}$  para avaliar a presença de sua progênie em diversos tecidos como fígado, músculo esquelético, cérebro e rim que expressassem marcadores específicos para cada tecido. Apenas no cérebro e no fígado foram encontradas células diferenciadas (numa frequência extremamente baixa). Os autores sugerem que a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas é um evento raro, mas não descartam a possibilidade de uma participação mais efetiva destas células no caso de um tecido com lesão ou funcionamento atípico. Diferentemente, Lagasse et al. (2000), observaram colônias de hepatócitos funcionais (constituindo 30% a 50% da massa hepática) em camundongos transgênicos deficientes para

fumarilacetoacetato hidrolase (FAH<sup>-/-</sup>) irradiados letalmente, após o transplante de células de medula óssea não fracionadas. Vieyra; Jackson; Goodell (2005), sugeriram o mecanismo de fusão (numa baixa frequência) para explicar a participação de células da medula (células mielóides) na regeneração de músculo esquelético após lesão com cardiotoxina, mas não em músculos saudáveis, uma vez que não foram encontradas células satélites derivadas do doador. Além dos trabalhos experimentais, estudos clínicos têm demonstrado a participação de células-tronco de medula óssea ou circulantes na regeneração de tecidos. Em uma revisão publicada por Korbling; Estrov; Champlin (2003), vários estudos clínicos demonstram a presença de quimerismo em pacientes que receberam transplante de órgão ou medula do sexo oposto, indicando a participação de células da medula na regeneração de diferentes tecidos. Alison et al. (2000), observaram numa baixa frequência (0,5% a 2%) hepatócitos derivados de células da medula óssea em pacientes do sexo feminino que receberam medula do sexo oposto, através da detecção do cromossomo Y. Theise et al. (2000), também observaram a presença de hepatócitos e colangiócitos de origem não hepática em pacientes transplantados com medula óssea ou fígado obtidos do sexo oposto. Korbling et al. (2002), realizaram um estudo com pacientes transplantados com células-tronco do sangue periférico de doadores do sexo oposto e observaram a presença de células tecido-específicas derivadas do doador no fígado, pele e trato gastrointestinal dos pacientes receptores numa frequência de 0 a 7%. Esses autores sugeriram então que células-tronco circulantes podem se diferenciar em hepatócitos e células epiteliais.

### 2.3.2 Células-tronco mesenquimais (MSC)

Uma subpopulação das células-tronco adultas também presentes na medula óssea são as células-tronco mesenquimais (MSC). Na medula óssea adulta fresca, constituem uma população muito rara, que representa de 0,01% a 0,0001% do total de células nucleadas encontradas nesse órgão (BYDLOWSKI et al., 2009), sendo por isso necessário o seu cultivo antes da utilização terapêutica e experimental. As MSC foram primeiramente descritas por Friedenstein; Chailakhjan; Lalykina (1970), como células aderentes ao plástico, de aspecto fibroblástico e capazes de formar colônia de fibroblastos. São células multipotentes e capazes de se diferenciar em células da linhagem mesenquimal incluindo adipócitos, condrócitos, osteócitos e miócitos e podem também sofrer transdiferenciação em hepatócitos, astrócitos e neurônios (ABUMAREE et al., 2012).

Os critérios mínimos definidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular para identificação das células mesenquimais humanas incluem: aderência ao plástico; expressão

em mais de 95% da população de CD105, CD73 e CD90 e não expressão dos marcadores CD45, CD34, CD14, ou CD11b, CD79a e HLA classe II; e capacidade de diferenciação *in vitro* em osteócitos, adipócitos e condrócitos (revisado por ABUMAREE et al., 2012).

A utilização das células mesenquimais de medula óssea ganhou muito destaque e importância devido às propriedades tais como a facilidade da sua obtenção, a capacidade de expansão em cultura sem a perda do seu potencial de diferenciação, a capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares, a capacidade de migrar para sítios de dano tecidual e reparar esse tecido através de diferenciação e substituição das células danificadas ou de criação de um microambiente favorável à recuperação tecidual pelas células endógenas (RIPOLL; BUNNELL, 2009), além de menores implicações éticas, diferentemente das células-tronco embrionárias.

Os estudos sobre o papel das MSC na fibrose hepática são controversos, apesar de a maioria dos trabalhos demonstrarem resultados positivos. Rabani et al. (2010), transplantaram MSC intravenosamente em camundongos com fibrose induzida por CCl<sub>4</sub> (tetracloreto de carbono) e observaram, 4 semanas após o tratamento, a redução de fibrose e também da expressão de colágeno, de  $\alpha$ SMA (alfa actina de músculo liso) e TIMP1 (inibidor tecidual de metaloproteinase 1), e o aumento da expressão da metaloproteinase MMP13 (importante na degradação do colágeno). Recentemente Iwamoto et al. (2013), utilizando o mesmo modelo experimental de fibrose induzida por CCl<sub>4</sub> e transplante venoso com células de medula óssea cultivadas ou não, encontraram resultados semelhantes aos de Rabani et al. (2010) em relação à fibrose e MMP9. Observaram também aumento nos níveis séricos de albumina, independentemente do tipo de célula transplantada (se cultivada ou não). Estes estudos demonstram o papel benéfico das células de medula óssea na regeneração hepática. Diferentemente dos trabalhos supracitados, Carvalho et al. (2008) não observaram uma melhora na fibrose ou função hepática após transplante de MSC através da veia porta em ratos com lesão crônica induzida por CCl<sub>4</sub>.

Alguns estudos têm demonstrado efeitos benéficos das MSC também na regeneração de lesões cardíacas, como na doença de Chagas. Em trabalho recente de nosso grupo Larocca et al., (2013) observaram que MSC derivadas de tecido adiposo humano transplantadas por via intraperitoneal promovem uma redução no número de células inflamatórias e na área de fibrose no coração de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*. No entanto, não foram observadas melhoras funcionais (arritmias e função cardiovascular) nos animais tratados em comparação com os controles. As MSC derivadas de medula óssea, quando transplantadas por via endovenosa, podem migrar em pequeno número para o coração de

camundongos agudamente infectados pelo *T. cruzi* e promover uma redução da dilatação do ventrículo direito que se observa na infecção pela cepa Brasil (JASMIN et al., 2012).

### 2.3.3 Monócitos

Os monócitos são células derivadas de células-tronco hematopoiéticas e constituem 5% a 10% das células nucleadas no sangue em humanos adultos (SETA; KUWANA, 2010). Diferem entre si em relação à capacidade fagocítica, capacidade de diferenciação e marcadores de superfície, sendo considerada uma população heterogênea (SETA; KUWANA, 2010). São encontrados no sangue periférico, de onde migram para diversos tecidos nos quais recebem denominação específica como células de Kupfer (fígado) e micróglia (cérebro).

Contudo, alguns estudos têm demonstrado que os monócitos podem se diferenciar em outros tipos celulares diferentes de macrófagos. Kuwana et al., (2003); Seta; Kuwana, (2007; 2010), encontraram no sangue periférico de humanos uma população positiva para marcadores de linhagem hematopoiética e monócitos (CD45, CD11b, CD14 e CD68), marcadores de células-tronco (CD34 e CD105) e marcadores de células endoteliais (VE-caderina e VEGFR1). Além de marcadores de linhagem mesenquimal como colágenos I e III, vimentina e fibronectina. Estes autores sugeriram que, quando submetidos a estímulos apropriados, os monócitos são capazes de se diferenciar (*in vitro*) principalmente em células endoteliais e numa baixa frequência em cardiomiócitos, células do músculo esquelético e células neurais.

Para diferenciação em linhagens cardiomiogênicas, por exemplo, é necessário o co-cultivo com cardiomiócitos do embrião de rato. Estes monócitos inicialmente apresentaram mudança de morfologia e expressão de fatores de transcrição específicos para cardiomiócitos como Nkx2.5, GATA-4 e eHAND. Com o passar do tempo estas células apresentaram capacidade de contração em sincronia com os cardiomiócitos de rato e expressaram proteínas estruturais específicas de cardiomiócitos como  $\alpha$ -actinina sarcomérica e troponina I. Para elucidar o mecanismo envolvido na geração dos cardiomiócitos a partir de monócitos os autores utilizaram diferentes marcadores fluorescentes (GFP nas células de rato e Dil-AcLDL nas células humanas) e observaram que os cardiomiócitos gerados apresentavam marcadores diferentes, indicando que não houve fusão (KODAMA et al., 2005).

Há estudos também demonstrando a diferenciação de monócitos humanos em hepatócitos, quando cultivados com meio específico para diferenciação. Os hepatócitos gerados foram capazes de expressar albumina, fator de coagulação VII e os citocromos P3A4,

P2C9 e P2B6. Além disso, produziram enzimas como lactato desidrogenase (LDH) e aspartato transaminase (ALT) (RUHNKE et.al., 2005).

## 2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO TECIDUAL

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados como ferramentas para avaliar a participação das células da medula óssea na regeneração de diferentes tecidos. Esses modelos tentam reproduzir as lesões da forma como se apresentam nos seres humanos.

### 2.4.1 LESÃO DE MÚSCULO CARDÍACO E ESQUELÉTICO

A indução de infarto do miocárdio tem sido utilizada por diversos autores (KAJSTURA et al., 2005; KOLLAR et al., 2009; WANG J et.al., 2010) para avaliar falência cardíaca, remodelamento tecidual e regeneração do músculo cardíaco. Orlic et al., 2001, utilizaram oclusão da artéria coronária esquerda para induzir infarto do miocárdio e falência cardíaca. Estes autores observaram melhora funcional e regeneração tecidual do miocárdio após transplante de uma população Lin<sup>-</sup>ckit<sup>+</sup> de células-tronco de medula óssea.

Já no músculo esquelético, alguns autores utilizam como modelo experimental as lesões produzidas por toxinas como notexina (CORBEL et al., 2003; SHERWOOD et al., 2004; ABEDI et al., 2005) e cardiotoxina (SHERWOOD et al., 2004; ABEDI et al., 2005).

Doenças parasitárias também podem ser utilizadas para avaliar a participação das células-tronco na regeneração tecidual, como é o caso da doença de Chagas. Nosso grupo tem desenvolvido diversos estudos nesta área, devido à alta prevalência da doença (principalmente nos países latino-americanos) e aos complexos mecanismos de lesão que se desenvolvem, sobretudo, no coração e músculo esquelético (no caso de infecção com cepas miotrópicas, como a cepa Colombiana).

A doença de Chagas, descrita pela primeira vez pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas em 1909, é uma zoonose provocada pelo parasita flagelado *Trypanosoma cruzi*. A doença apresenta duas fases principais: aguda e crônica. Na fase aguda, grande quantidade de formas tripomastigotas são encontradas no sangue periférico, e pode-se observar formas amastigotas que se multiplicam dentro de diferentes tipos celulares do hospedeiro (KOBBERLE, 1968; ANDRADE, 1983), principalmente em células musculares cardíacas (SOARES; SANTOS, 1999), provocando miosite intensa devido à ruptura dos miócitos com conseqüente liberação do conteúdo celular e de restos de parasitas (ANDRADE et al., 1994). Além da inflamação, mudanças sugestivas de lesão isquêmica no músculo cardíaco estão



geralmente presentes e podem ser detectadas eletrocardiograficamente. Alterações variadas na onda T e no segmento ST e baixa voltagem do QRS estão geralmente presentes (ANDRADE et al., 1994). Alterações sugestivas de infarto agudo do miocárdio também têm sido observadas em humanos (ANDRADE et al., 1978) e animais experimentais (ANDRADE, 1984).

A doença progride para a fase crônica, na qual parasitos já não são encontrados com facilidade no sangue periférico e nos tecidos. Quando nenhum sintoma clínico ou alterações histopatológicas significativas são encontrados, o paciente encontra-se na fase inderteminada, que pode durar décadas (SOARES; SANTOS, 1999). No entanto, cerca de 30% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* desenvolvem a forma sintomática da doença (SOARES; PONTES-DE-CARVALHO; RIBEIRO-DOS-SANTOS, 2001), para a qual não existe tratamento efetivo (TANOWITZ et al., 2009). A cardiomiopatia chagásica crônica, uma das principais causas de falência cardíaca em diversos países da América Latina, é clinicamente evidente e pode incluir disfunção biventricular grave, insuficiência cardíaca progressiva, distúrbios graves da condução atrioventricular e intraventricular, arritmias ventriculares complexas, fenômenos tromboembólicos e cardiomegalia, com elevados índices de morbidade e mortalidade, seja por falência miocárdica ou por morte súbita. Histologicamente verifica-se uma miocardite linfocitária difusa, escassos ninhos de parasitas, fibrose intersticial difusa e atrofia dos miócitos (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A miocardite chagásica crônica apresenta-se como um processo dinâmico, o qual se reativa periodicamente em focos que evoluem para a fibrose, podendo-se observar lesões em diferentes fases de evolução ao exame microscópico (ANDRADE, 2001; REY, 2001). O infiltrado inflamatório mononuclear e a fibrose dominam o quadro e há predominância de linfócitos T CD8<sup>+</sup> sobre T CD4<sup>+</sup>. Todos os tipos de fibrose miocárdica descritos (focal, difuso, intersticial, perivascular, plexiforme) podem ser encontrados, até mesmo numa mesma secção histológica (ANDRADE, 2001). A substituição das fibras musculares por tecido conjuntivo provoca redução da força de contração do coração promovendo mecanismos compensatórios como aumento do diâmetro das fibras musculares cardíacas, cardiomegalia e taquicardia (REY 2001). Além disso, é um fator decisivo no mecanismo de insuficiência cardíaca. Observa-se também arterites necrosantes, zonas hemorrágicas e áreas de microenfarte (ANDRADE, 2001).

As duas drogas disponíveis para tratamento antiparasitário - nifurtimox (Lampit, Bayer 2502) e benzonidazol (Rochagan, Roche 7-1051) - não apresentam resultados suficientemente satisfatórios e podem causar diversos efeitos colaterais. Estas drogas reduzem a gravidade da doença, e acredita-se que 70% dos indivíduos alcancem cura parasitológica, embora não existam grandes estudos que comprovem esses números. Além disso, essa taxa de cura decresce em função do tempo de infecção e talvez menos de 10% dos indivíduos com infecção crônica possam ser curados. Atualmente este tratamento é recomendado apenas para pacientes com infecção aguda e crianças com infecção crônica. Pessoas com doença cardíaca chagásica crônica com cardiomiopatia dilatada e falência cardíaca congestiva (classe III e IV) podem se beneficiar do transplante cardíaco (TANOWITZ et al., 2009). Entretanto, essa alternativa pode levar à reativação da infecção devido à imunossupressão, além de suscitar questões que envolvem a baixa disponibilidade de doadores, o alto custo e os riscos do procedimento.

#### 2.4.2 DOENÇA DE CHAGAS E TERAPIA CELULAR

Diante deste cenário, a terapia com células-tronco adultas tem se tornado uma alternativa plausível. Utilizando camundongos transgênicos para a proteína verde fluorescente (GFP), Orlic et al., (2001) demonstraram que células-tronco hematopoiéticas transplantadas no coração de camundongos singênicos com infarto do miocárdio se diferenciaram em músculo cardíaco e células vasculares. Em outro estudo, Soares et al., (2004), demonstraram redução de inflamação e fibrose no coração de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* seis meses após a terapia celular. Estes resultados permitiram a realização de um estudo clínico fase I no qual pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia chagásica foram transplantados com células mononucleares de medula óssea. Observou-se neste estudo melhora na qualidade de vida, fração de ejeção e tempo de caminhada, além de normalização dos níveis de sódio sérico (DOS SANTOS; SOARES; DE CARVALHO, 2004; SOARES; DOS SANTOS, 2008). Contudo, em estudo de passe II, Ribeiro dos Santos et al., 2012 não observaram melhora de função do ventrículo esquerdo e qualidade de vida em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica após transplante por via intracoronária.

O conhecimento da participação espontânea das células de medula óssea no processo de regeneração das graves lesões que ocorrem nos músculos esquelético e cardíaco durante a doença de Chagas pode contribuir para a utilização destas células de forma mais eficiente.

#### 2.4.3 LESÃO HEPÁTICA

O fígado também é um órgão alvo de muitas pesquisas na área de medicina regenerativa devido a diversas agressões que este órgão está sujeito como agentes infecciosos como vírus (hepatites B e C principalmente), doenças genéticas (doença de Wilson, tirosinemia tipo I), autoimunes (hepatite autoimune) e parasitárias (esquistossomose e capilaríase hepática) e agentes químicos em excesso como álcool e acetaminofen. Estes diversos agentes causam lesão crônica no fígado, e apesar da sua alta capacidade regenerativa, podem levar a falência do mesmo.

Fibrose e cirrose representam as consequências comuns de quase todas as doenças crônicas hepáticas. A fibrose avançada é caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular rica em colágenos fibrilares que resulta em falência hepática e hipertensão portal, associado ao risco elevado de câncer de fígado (IREDALE, 2007). Atualmente o único tratamento efetivo para a cirrose é o transplante hepático, no entanto, devido á baixa disponibilidade de órgão e as possíveis complicações pós-transplante, se faz necessário o desenvolvimento de terapias anti-fibrogênicas. Para isso, um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na regeneração hepática é de fundamental importância. Nesse contexto, os modelos experimentais de lesão/regeneração hepática são ferramentas importantes.

Diversos modelos experimentais podem ser utilizados com este propósito, entre eles a cultura de células em que células altamente purificadas obtidas a partir de fígados normais ou com lesão induzida experimentalmente são estudadas *in vitro* (FRIEDMAN et al., 1992; GEERTS, 2001). Este tipo de abordagem facilita o estudo de mediadores específicos mas não reproduz o que ocorre *in vivo* que resulta da interação com outros tipos celulares e com o microambiente (IREDALE, 2007). Uma outra abordagem inclui tecidos humanos obtidos de explantes e biópsias (WANLESS; NAKASHIMA; SHERMAN, 2000) mas considerações éticas não permitem a realização de biópsias consecutivas em pacientes e, muitas vezes, as amostras obtidas tendem a ser representativas da doença apenas em estágio avançado. Por fim, os modelos animais são os mais utilizados, pois muitos deles mimetizam as doenças humanas, permitem o estudo detalhado de mecanismos celulares e moleculares e animais “knockout” ou geneticamente modificados possibilitam o estudo individual de mediadores e células (IREDALE, 2007).

Koniaris et al., (2003), revisaram diversos modelos experimentais de regeneração hepática entre eles: galactosamina, CCl<sub>4</sub>, ligadura de ducto biliar, hepatectomia parcial, isquemia/reperfusão, entre outros. Diferentes agentes tóxicos provocam lesão em

subpopulações celulares específicas e resultam na proliferação de diferentes tipos celulares para repor a população perdida. Por exemplo, a D-galactosamina causa lesão pan-hepatocelular e a regeneração se dá pela proliferação de células-tronco hepáticas (células ovais) uma vez que esta droga deixa os hepatócitos incapazes de proliferar. Contrariamente, o modelo de isquemia/reperfusão produz necrose massiva de hepatócitos pericentrais e a regeneração ocorre pela proliferação de hepatócitos (KONIARIS et al., 2003).

Nosso grupo tem desenvolvido trabalhos utilizando como modelo de lesão hepática a infecção pelo *S. mansoni* ou intoxicação com tetracloreto de carbono. O CCl<sub>4</sub> provoca lesão hepática devido à formação de radicais livres durante sua metabolização, levando a peroxidação lipídica e redução da síntese hepática de proteínas e do transporte de lipídios pelos hepatócitos com consequente esteatose hepática. Ocorre também aumento da permeabilidade da membrana plasmática com influxo de cálcio e morte celular (RECKNAGEL, 1967; BOLL et al., 2001). O uso prolongado desta substância induz a formação de cirrose em ratos (DI VINICIUS et al., 2005) e camundongos (OLIVEIRA et al., 2012).

A esquistossomose é uma doença provocada pelo parasito digenético *Schistosoma mansoni*, que vive dentro do sistema venoso portal-mesentérico do homem onde as fêmeas depositam seus ovos. Dessa forma, o fígado é o alvo do insulto patogênico e dano patológico subsequente. O grau de lesão é variável e depende principalmente da carga parasitária, podendo ocorrer desde granulomas periovulares isolados distribuídos pelo fígado até fibrose periportal com inflamação granulomatosa crônica e lesões vasculares obstrutivas severas. O granuloma periovular se forma quando o miracídio presente dentro do ovo começa a liberar secreções líticas e antigênicas através de microporos presentes na casca. Tal granuloma é uma lesão essencialmente inflamatória e fibrosante que se torna encapsulado pela formação de anéis de colágeno depositados em sua periferia (ANDRADE, 2009).

Ainda não se sabe exatamente porque menos de 10% dos indivíduos de áreas endêmicas desenvolvem a forma hepatoesplênica da doença. Vários fatores parecem contribuir para este processo como: tempo de infecção, ocorrência de reinfecções, carga parasitária, defeitos afetando o mecanismo de modulação imunológica dos granulomas periovulares, ajuste hepático vascular, fatores nutricionais e associados à biologia da matriz extracelular do fígado (ANDRADE, 2009).

As interações parasito-hospedeiro que ocorrem na esquistossomose podem ser utilizadas para entender várias características importantes da fibrose hepática como, seu início e regulação, o papel das alterações vasculares, a dinâmica da formação da fibrose e sua regressão com tratamento antiparasitário, contribuição imunológica do hospedeiro e a fisiopatologia da hipertensão portal (ANDRADE, 2009). O modelo experimental de esquistossomose em camundongos é considerado adequado porque os animais infectados com carga parasitária reduzida desenvolvem após 16 semanas de exposição, os dois quadros anatomo-patológicos da doença correspondente às formas hepatointestinal com presença de granulomas isolados e hepatoesplênica com fibrose periportal semelhante à fibrose “pipestem” encontrada em seres humanos (ANDRADE; CHEEVER, 1993).

#### 2.4.4 LESÃO HEPÁTICA E TERAPIA CELULAR

Em trabalho do nosso laboratório, utilizando camundongos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* transplantados com células mononucleares de medula óssea, observou-se que algumas destas células estavam presentes na área do granuloma e outras no parênquima hepático (positivas para albumina). Além disso, os animais transplantados também apresentaram redução significativa da fibrose, da área do granuloma e dos níveis de TGF- $\beta$   $\square$  maior número de células precursoras (células ovais) e geração de novos hepatócitos e/ou melhora de função dos hepatócitos residentes, uma vez que um maior número de grânulos de albumina foram encontrados (OLIVEIRA et al., 2008). Resultados semelhantes em relação à migração das células transplantadas também foram observados por Elkhafif et al., (2010), em camundongos com infecção crônica pelo *S. mansoni* transplantados com células-tronco de medula óssea. Utilizando outro modelo de fibrose, induzida pela administração de CCl<sub>4</sub>, Sakaida et al., (2004) observaram que as células de medula óssea migram para a área da lesão e expressam MMP-9, promovendo a redução de fibrose.

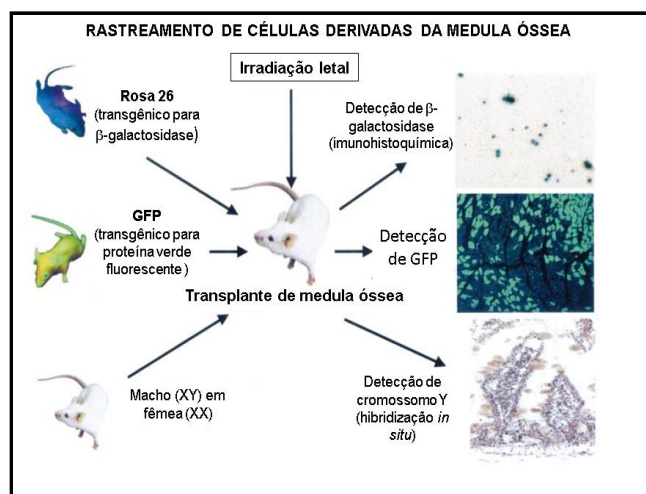
Esses trabalhos demonstram que as células de medula óssea participam na regeneração hepática, porém as populações celulares envolvidas ainda não foram bem estudadas. O uso de animais quiméricos nos modelos experimentais de esquistossomose permite avaliar a participação dos diferentes tipos celulares presentes na medula óssea nos processos de formação das lesões e da fibrose e na regeneração tecidual.

#### 2.5 ANIMAIS QUIMÉRICOS COMO FERRAMENTA DE INVESTIGAÇÃO

Diversos estudos têm utilizado animais quiméricos como ferramenta para investigar a participação das células de medula óssea endógena no processo de regeneração em diferentes tecidos como coração (FUKUDA; FUJITA, 2005) músculo esquelético (CAMARGO et al., 2003) e fígado (ALVAREZ-DOLADO et al., 2003; LAGASSE et al., 2000). Nosso grupo demonstrou recentemente a presença de hepatócitos derivados da medula óssea em camundongos quiméricos com lesão hepática crônica induzida pelo CCl<sub>4</sub> (OLIVEIRA et.al., 2011).

Essa abordagem permite o rastreamento das células derivadas da medula óssea com o uso de marcadores específicos, uma vez que as células de medula óssea de um animal podem ser substituídas por células de animais transgênicos para proteínas específicas como GFP ou beta galactosidase, ou ainda pela composição cromossômica (no caso de sexo cruzado), como demonstrado na figura 2. Dessa forma, é possível identificar não só o tipo celular envolvido, uma vez que a reconstituição da medula pode ser realizada com populações celulares específicas (MSC, HSC, EPC), como também o processo envolvido (fusão ou transdiferenciação).

Além dos estudos experimentais, ensaios clínicos com pacientes que receberam transplante de medula óssea do sexo oposto, também tem demonstrado a presença de células derivadas da medula em tecidos como fígado (ALISON et al., 2000; THEISE et al., 2000) e coração (MULLER et al., 2002).



**Figura 2:** Modelos experimentais para rastreamento de células derivadas da medula óssea (modificado de FORBES et al., 2002).

## 2.6 FATORES DE RECRUTAMENTO

Quimiocinas fazem parte de uma família de citocinas com a função de regular a migração de leucócitos do sangue periférico para os tecidos. Diferentes quimiocinas agem sobre diferentes células e assim controlam o tipo de infiltrado inflamatório (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2007). As quimiocinas são subdivididas em quatro famílias (CC, CXC, CX<sub>3</sub>C e C) de acordo com o arranjo dos dois primeiros resíduos de cisteína da porção N-terminal (TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002). As proteínas quimioatrativas de monócitos (MCP, da sigla em inglês), fazem parte da família CC, são secretadas por diferentes tipos celulares em resposta a inflamação e agem no recrutamento de monócitos para os tecidos (PAIVA et al., 2009). Além de atrair monócitos, MCP-1 (CCL2), participa da fagocitose e destruição de *T. cruzi* pelos macrófagos (PAIVA et al., 2009).

Além do recrutamento de monócitos, algumas quimiocinas (como SDF-1/CXCL12) podem participar do recrutamento de células-tronco. As células-tronco hematopoiéticas são encontradas em nichos específicos dentro do microambiente da medula óssea. Contudo, sabe-se que ocorre um processo fisiológico de aumento da mobilização destas células a partir da medula óssea para o sangue periférico em resposta a sinais de estresse liberados por órgãos e tecidos quando ocorrem lesão e processos inflamatórios nos mesmos (NERVI et al., 2006). A transição entre o estado quiescente e ativado, bem como a migração das células-tronco hematopoiéticas é controlado por uma complexa rede de fatores de crescimento e citocinas (MIMEAULT; HAUKE; BATRA, 2007). SDF-1 (CXCL12) é uma quimiocina responsável pelo recrutamento de células-tronco mesenquimais, seu receptor CXCR4, está presente em células endoteliais, células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais (LAU; KANE, 2010). A elevação nos níveis de SDF-1 no sangue pela administração de CXCL12 ou pela injeção de um vetor adenoviral expressando CXCL12 está associada a uma significativa mobilização de células-tronco hematopoiéticas para o sangue (NERVI; LINK; DIPERSIO, 2006).

Há evidências que quimiocinas secretadas pelos tecidos lesionados promovem o recrutamento de células-tronco da medula óssea para o local da lesão, onde contribuem para a posterior regeneração dos diferentes tecidos como músculos cardíaco e esquelético e do tecido hepático. Entender quais células são recrutadas e como estas contribuem para os diferentes tipos celulares envolvidos na regeneração das lesões provocadas pelos parasitas *T. cruzi* e *S. mansoni*, causadores de duas importantes doenças endêmicas em nosso meio, pode levar a novas abordagens no tratamento destas infecções debilitantes para milhões de pessoas.

### 3.0 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação das células de medula óssea no reparo tecidual em modelos experimentais de lesões provocadas pelo *T. cruzi* e *S. mansoni* utilizando camundongos quiméricos de medula óssea.

### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o perfil de células mobilizadas para o sangue periférico durante a infecção pelo *T. cruzi* e *S. mansoni*;
- Avaliar, no coração e músculo esquelético, expressão gênica de quimiocinas envolvidas no recrutamento de células inflamatórias e células-tronco;
- Caracterizar as populações celulares derivadas da medula óssea recrutadas para os sítios de lesões através de imunofluorescência.



#### 4.0 MANUSCRITO I

Neste trabalho nós avaliamos as populações de células derivadas da medula óssea recrutadas para o sangue periférico em animais na fase aguda da doença de Chagas. Posteriormente, animais quiméricos de medula óssea foram produzidos através de irradiação letal e reconstituição da medula com células GFP. Após um mês, estes animais foram infectados ou não com tripomastigotas de *T. cruzi* para investigar a contribuição das células de medula óssea no reparo das lesões teciduais nas fases aguda e crônica.

BONE MARROW CELLS MIGRATE TO THE HEART AND SKELETAL MUSCLE AND PARTICIPATE IN TISSUE REPAIR AFTER *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION

Carine Machado Azevedo<sup>1,2\*</sup>, Bruno Solano de Freitas Souza<sup>1,2\*</sup>, Ricardo Santana de Lima<sup>1</sup>, Carla Martins Kaneto<sup>2</sup>, Juliana Fraga Vasconcelos<sup>1,2</sup>, Elisalva Teixeira Guimarães<sup>1</sup>, Ricardo Ribeiro dos Santos<sup>1,2</sup>, Milena Botelho Pereira Soares<sup>1,2</sup>□

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Rua Waldemar Falcão, 121. Candeal 40296-710 - Salvador, BA – Brazil

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael. Av. São Rafael, 2152. São Marcos 41253-190 - Salvador, BA, Brazil.

□ **Correspondence to:** Milena B. P. Soares

Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael. Av. São Rafael, 2152. São Marcos 41253-190 - Salvador, BA, Brazil

Tel: 55 71 3281-6455, Fax: 55 71 3281-6489

E-mail: [milena@bahia.fiocruz.br](mailto:milena@bahia.fiocruz.br)

\* These authors have equally contributed to this work.

## Abstract

Infection by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, causes an intense inflammatory reaction triggered by the presence of parasites in several tissues, including the myocardium. We have previously shown that transplantation of bone marrow cells ameliorates the myocarditis in a mouse model of chronic Chagas disease. Here we investigated the participation of bone marrow-derived cells in the repair of lesions in the heart and skeletal muscle caused by *T. cruzi* infection in mice. For this purpose, we first evaluated the mobilization of bone marrow cells and then tracked the fate of mobilized cells in chimeric mice. Infection with a myotropic *T. cruzi* strain induced an increase in the percentage of stem cells and monocytes in the peripheral blood, as well as in gene expression of chemokines SDF-1, MCP1, 2, and 3 in the heart and skeletal muscle. In order to investigate the fate of bone marrow cells within the damaged tissue, chimeric mice generated by syngeneic transplantation of GFP<sup>+</sup> bone marrow cells into lethally irradiated wild-type recipient mice were infected with *T. cruzi*. Migration of GFP<sup>+</sup> bone marrow-derived cells to the heart and skeletal muscle was seen during and after the acute phase of infection. GFP<sup>+</sup> cardiomyocytes and endothelial cells were found in heart sections of chimeric chagasic mice. In addition, GFP<sup>+</sup> myofibers were observed in the skeletal muscle of chimeric mice at different time points following infection. The production of IGF-1 was increased in the heart and skeletal muscle, whereas VEGF was significantly increased only in skeletal muscle of infected mice. In conclusion, bone marrow-derived cells migrate and contribute to the formation of new resident cells in the heart and skeletal muscle, which can be detected both during the acute as well as the chronic phase of infection. These findings reinforce the role of bone marrow-derived cells in tissue regeneration.

**Keywords:** Chagas disease; Bone marrow cells; Chimeric mice; Myocytes; Tissue repair.

## Introduction

Chagas disease is a zoonosis caused by the flagellate parasite *Trypanosoma cruzi*. The disease is endemic in Mexico, Central and South America and continues to represent a major public health problem (1). The prevalence of human *T. cruzi* infection is estimated at 15-16 million cases, with approximately 75-90 million people currently at risk of infection in Latin American countries (2).

The infection progresses into two consecutive phases: acute and chronic (3). The acute phase of the disease is transient, characterized by the presence of parasitic trypomastigote forms in the peripheral blood and amastigote proliferation within several host cell types; however acutely infected individuals lack major clinical signs or present symptoms of minor relevance (3). An intense inflammatory reaction is triggered by the parasite presence within tissues that results in destruction of unparalleled proportions in the myocardium (4, 5). However, following control of parasitemia, affected organs undergo a regenerative process. In humans, the acute phase regresses spontaneously after approximately 12 months, demonstrating a reduction of blood and tissue parasites (4, 5). Following the acute phase, the indeterminate form is observed, in which roughly 70% of infected individuals remain free of clinical symptoms, as detected radiologically or by electrocardiogram, for many years or a lifetime. About 30 % of the individuals infected by *T. cruzi* develop the symptomatic form of the disease, for which there is no effective treatment (5). The cardiac manifestations include abnormalities of the intraventricular conduction system, sinus node dysfunction, aneurysm and heart enlargement and dysfunction, resulting high rates of mortality (6).

Stem cell-based therapies offer a new frontier for the treatment of chronic degenerative diseases, including those affecting muscle and heart tissues. The bone marrow is an easily accessible source of stem cells and its potential therapeutic applications have been intensely investigated. A number of studies have shown that bone marrow-derived stem cells migrate to various organs, such as skeletal muscle and heart (7-11), and may contribute to the formation of new specialized cells.

In previous studies, we have shown that transplantation of BMCs obtained from both chagasic and naïve mice reduced the inflammatory infiltrates and fibrosis in chronic chagasic mice. By using bone marrow cells from GFP-transgenic donors, it was observed GFP<sup>+</sup> cardiomyocytes in the hearts of chronic chagasic mice 4 days after transplantation (12, 13). However, other issues remain to be addressed as it is still not clear whether BMC are

differentiating into GFP<sup>+</sup> cardiomyocytes during different stages of the cardiomyopathy development, and how BMCs are specifically attracted to the sites of damaged tissue. In fact, most the literature dedicated to investigating BMCs in Chagas disease is based on cell transplantation (12-15), while no other study has evaluated the participation of endogenous BMC. Here, the mobilization and recruitment of bone marrow cells were studied in acutely infected mice. Secondly, the migration and fate of BMC during the development of Chagas disease were studied in infected BMC chimeras. By performing these experiments, we present evidence regarding the contribution of bone marrow-derived cells, as well as the role of inflammatory mediators, in lesions affecting the heart and skeletal muscle. These observations may open new avenues for the development of cell-based therapies for heart and muscle regeneration.

## **Materials and Methods**

### *Animals*

Six to eight week old female C57BL/6 mice were used as recipients for the production of chimeric animals. Four week-old male C57BL/6 mice, transgenic for enhanced green fluorescent protein (GFP) were used as bone marrow cells donors for reconstitution of irradiated mice. All mice were raised and maintained in the animal facilities at the Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ/BA, and provided with rodent food 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.

### *Generation of chimeric mice*

C57BL/6 female mice were irradiated with 6 Gy for bone marrow cell depletion in a <sup>137</sup>Cesium source irradiator (CisBio International, Codolet, France). Bone marrow cells were obtained from femurs and tibiae from male GFP transgenic mice and used to reconstitute irradiated mice. The mononuclear cells were purified by centrifugation in Ficoll gradient at 1000 g for 15 minutes (Histopaque 1119 and 1077, 1:1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After two washings in DMEM medium (Sigma-Aldrich), the cells were filtered over nylon wool, resuspended in saline, and 200 µL were injected intravenously at 1 x 10<sup>7</sup> cells per mouse in all irradiated mice.

### *Parasites and infection*

Trypomastigotes of the myotropic Colombian *T. cruzi* strain (20) were obtained from culture supernatants of infected LLC-MK2 cells. Infection of normal and chimeric mice was performed by intraperitoneal injection of 1000 or 100 *T. cruzi* trypomastigotes in saline, respectively. Chimeric mice were infected 30 days after bone marrow transplantation. Parasitemia of infected mice was evaluated at various time points following infection by counting the number of trypomastigotes in peripheral blood aliquots. Twenty-eight days after infection, chimeric animals were treated daily for one week with 40 mg/kg of benznidazole (Lafepe, Recife, Brazil) diluted in saline to control the parasitemia.

### *Morphometric analysis*

Groups of animals were euthanized 33, 66 and 192 days after infection and different organs were removed and fixed in 10% buffered formalin. Tissue sections were analyzed by light microscopy following paraffin embedding, and then stained using a standard hematoxylin/eosin protocol. Inflammatory cells infiltrating heart and skeletal tissues were counted using a digital morphometric evaluation system. Images were digitalized using a color digital video camera adapted to a microscope. The images were analyzed using the Image Pro Plus Program (Media Cybernetics; San Diego, CA, USA), where inflammatory cells were counted and integrated with respect to area. Ten fields ( $100 \mu\text{m}^2$ ) per section were counted in one section per heart.

### *Sample preparation and real-time RT-PCR*

The RNA was harvested from hearts and skeletal muscle and was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen; Carlsbad, CA USA) with concentration determined by photometric measurement. The RNA quality was analyzed in 1.2% agarose gel. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) was used to synthesize cDNA from 2  $\mu\text{g}$  of RNA following manufacturer's recommendations. Real-time RT-PCR assays were performed to detect the expression levels of *Sdf-1/CxCl12* (Mm 00443552\_m1), *Ccl2/MCP-1* (Mm 00441242\_m1), *Ccl8/MCP-2* (Mm 01297183\_m1), *Ccl7/MCP-3* (Mm 00443113\_m1), *IGF-1* (Mm00439561\_m1) and *VEGF*

(Mm00437304\_m1). Amplification of qRT-PCR mixtures were performed with Universal Master Mix (Applied Biosystems) and the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Cycling conditions were comprised of 10 min polymerase activation at 95°C, 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. Normalization was conducted with the target internal control *GAPDH*, using the cycle threshold method.

### *Immunofluorescence analysis*

Ten- $\mu$ m frozen sections or 5  $\mu$ m paraffin-embedded sections of hearts, livers, spleen and skeletal muscle were obtained and used for detection of GFP<sup>+</sup> cells. The following primary antibodies were used: chicken anti-GFP (1:500, Aves Labs; Tigard, OR, USA), rabbit anti-myosin (1:200, Sigma Aldrich), rabbit anti-von Willebrand Factor (1:50, Zymed Laboratories; San Francisco, CA, USA), mouse anti-PCNA (1:200, Dako Denmark A/S; Glostrup, Denmark) biotinylated with Dako Ark kit and mouse anti-Pax-7 (1:200, DSHB; Iowa city, IA, USA) stained using M.O.M. kit (Vector Labs; Burlingame, CA, USA). Secondary antibodies, anti-chicken Alexa Fluor 488 conjugated (1:200, Molecular Probes; Carlsbad, CA, USA) and anti-rabbit Alexa Fluor 568 conjugated (1:200, Molecular Probes), were used. For biotinylated antibodies stained sections, we used streptavidin Alexa Fluor 568-conjugated (1:200, Molecular Probes). Some heart sections were stained with phalloidin Alexa fluor 633 conjugated (1:100, Molecular Probes) Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Labs). Images were collected using the confocal microscope, FluoView 1000 (Olympus; Tokyo, Japan).

### *Flow cytometry analysis*

Quantitative analysis of Sca-1<sup>+</sup> and monocytes cells was performed in the blood of acute chagasic mice, by flow cytometry. Cells were stained with labeled anti-mouse CD45 PE-Cy5.5, CD11b APC, CD34 PE, CD90 APC, SCA-1 FITC, F4/80 PerCP-Cy5 and Ly-6C/6G APC-Cy7 antibodies (BD Biosciences; San Diego, CA, USA) for 20 min, at room temperature. Red blood cells were lysed with lysis solution for 10 minutes at room temperature. Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS), resuspended in 500  $\mu$ l of PBS and then analyzed using the cell analyzer, LSRFortessa with FACSDiva software version 6.1.3 (BD Biosciences). To confirm the presence of GFP<sup>+</sup> cells in chimeric

mice, blood samples of irradiated and reconstituted mice were evaluated after 30 days of transplantation. Blood samples obtained from wild-type and GFP transgenic C57BL/6 mice were used as negative and positive controls, respectively. Acquisition and analysis were performed using a FACScalibur cytometer with the CellQuest software (BD Biosciences). At least 10,000 events were collected.

### *Statistical analyses*

Statistical comparisons between groups were performed by Student's *t*-test when comparing two groups and analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons, using GraphPad Prism program (Software Inc., San Diego, USA) version 5.0. Results were considered significant when  $P < 0.05$ .

## **Results**

### *Infection with T. cruzi increases percentage of circulating stem cells and monocytes as well as chemokines expression in the heart and skeletal muscle*

The mobilization of different cell subpopulations from the bone marrow was evaluated in the peripheral blood taken from C57BL/6 mice infected with Colombian *T. cruzi* strain. At the peak of infection (30 days after infection), a significant increase in the number of Sca-1<sup>+</sup> cells and monocytes was observed in infected mice, when compared to naïve controls (Table 1). The Sca-1<sup>+</sup> cells expressed either a mesenchymal stem cell markers (CD90<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>) or hematopoietic progenitor cell phenotype (CD34<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>). Two monocyte subpopulations, expressing LY6C<sup>hi</sup> and LY6C<sup>lo</sup>, were also observed (Table 1).

The expression of chemokines participating in the recruitment of macrophages and stem cells was investigated at the transcriptional level by qRT-PCR in the heart and skeletal muscle. Gene expression of SDF-1 (CXCL12) in the heart was found to be similar between naïve and *T. cruzi*-infected mice. In contrast, SDF-1 expression in skeletal muscles increased in *T. cruzi* infected mice in comparison to naïve (Figure 1). The expression of MCP1, 2 and 3



genes was significantly increased in both heart and muscle tissues of infected mice when compared to naïve mice (Figure 1).

*Presence of GFP<sup>+</sup> cells in the heart and skeletal muscle of T. cruzi-infected chimeric mice*

To investigate the fate of mobilized bone marrow cells after *T. cruzi* infection, we generated bone marrow chimeric mice by transplanting GFP<sup>+</sup> bone marrow cells into lethally irradiated C57BL/6 recipients (Figure 2). One month after reconstitution, chimeric mice were infected with 100 *T. cruzi* trypomastigotes and treated for one week with benznidazole, 28 days post-infection. A decrease of parasitemia levels in these animals was observed after the 30<sup>th</sup> day of infection (Figure 3A). The numbers of inflammatory cells in the heart and skeletal muscle were quantified. As shown in figure 3B, the number of inflammatory cells in the heart tissue is higher during the peak of parasitemia (33 days after infection), decreasing after 192 days of infection. In contrast, the number of inflammatory cells remained high in skeletal muscle in all analyzed time points (Figure 3C).

Each time point analyzed revealed some populations of GFP<sup>+</sup> cardiomyofibers. The GFP<sup>+</sup> cardiomyocytes were positively stained with an anti-myosin antibody or phalloidin (Figures 4A-C), and were visualized as a group of adjacent cells or individual cells within the myocardium. In contrast, heart sections of uninfected chimeric mice had sparse or no GFP<sup>+</sup> cells present (Figure 4D). The GFP<sup>+</sup> cells found in the hearts of uninfected chimeric mice did not present cardiomyocyte morphology characteristic, in addition to lacking myosin expression.

A significant number of GFP<sup>+</sup> myofibers were found at all analyzed time points (Figures 5A-C). Additionally, these GFP<sup>+</sup> cells also expressed myosin. GFP<sup>+</sup> myofibers in skeletal muscle sections obtained from uninfected chimeric mice were not observed, which included mice euthanized at the 192<sup>th</sup> day (Figure 5D).

In addition to myofibers, GFP<sup>+</sup> cells were found within endothelial cells of chagasic heart blood vessels (Figure 6A), but were not observed in uninfected chimeric mice (Figure 6B). A subpopulation of these GFP<sup>+</sup> cells was positive for von Willebrand factor, an endothelial cell marker. However, GFP<sup>+</sup> satellite cells were not found in skeletal muscle of chimeric mice in all time points analyzed, as shown by Pax7 stain (Figures 6C and D). GFP<sup>+</sup>

cells were also observed in other organs of chimeric chagasic mice, such as liver and spleen (data not shown).

#### *Presence of proliferating GFP<sup>+</sup> cells in inflammatory foci*

Heart and skeletal muscle sections of chimeric mice euthanized at different time points following infection presented a massive influx of GFP<sup>+</sup> inflammatory cells. Some GFP<sup>+</sup> cells observed in inflammatory infiltrates of cardiac and skeletal muscle had positive nuclear staining for PCNA, a marker of cell proliferation (Figures 6E and F). However, myofibers expressing GFP and PCNA were not found in any heart or skeletal muscle sections analyzed.

#### *Acute T. cruzi infection upregulates the gene expression of IGF-1 and VEGF*

The mRNA expression of IGF-1 and VEGF was investigated in the skeletal muscle and hearts of *T. cruzi*-infected mice by qRT-PCR. A significant increase in IGF-1 mRNA levels was observed in both hearts as well as skeletal muscle samples of infected mice, when compared to normal mice (Figures 7A and C). In contrast, VEGF mRNA levels were significantly increased in the skeletal muscle, but not in the hearts of infected mice, when compared to normal mice (Figures 7B and D).

## **Discussion**

Acute infection by *T. cruzi* causes intense tissue damage in several organs, but an intense tissue regeneration process occurs when parasitemia is controlled by the immune response. However, little is known about the mechanisms by which this tissue repair occurs in Chagas disease. A more complete understanding of the cells and molecules naturally involved in tissue repair may open new avenues for the development of novel therapies. In the present study we demonstrated that bone marrow-derived cells migrate and contribute to the formation of new resident cells in the heart and skeletal muscle, both during the acute as well as the chronic phase of infection.

We have previously shown that therapy with bone marrow mononuclear cells contributed to tissue repair during the chronic phase of Chagas disease (12,13). Previous studies have reported the presence of bone marrow derived-myocytes following acute myotoxic injury (16, 17). It has been suggested that these cells are the product of fusion between damaged myofibers and bone marrow-derived cells (17). In these studies, the frequency of bone marrow-derived myofibers was reported to be very low, even in the

presence of muscle injury, where increased frequencies are typically observed (16). However, the number of bone marrow-derived cells are increased in a Duchenne muscle dystrophy experimental model, which most likely is due to a selective advantage (18). In the present study, we showed that persistent inflammation leads to an increased number of bone marrow-derived cells compared to those previously reported in acute injury experimental models. Furthermore, we observed different intensities of fluorescence emission between the populations of GFP<sup>+</sup> myocytes, which could be the result of a fusion between different numbers of bone marrow-derived cells. Therefore, it is possible that the number of bone marrow derived-cells is proportional to the degree of the inflammatory process found in each mouse model.

In *T. cruzi*-infected mice, the different degrees and patterns of inflammation are observed can vary depending on the genetic background of the host (19). Here we used the myotropic Colombian strain of *T. cruzi* (20), which causes intense inflammation in the heart and skeletal muscles. The inflammation in chimeric mice was persistent, lasting for over 6 months of infection. The presence of a continual and intense inflammation may be a relevant factor for stem cell recruitment. In fact, the production of SDF-1, a chemokine known to recruit stem cells through binding at the cell surface receptor, CXCR4 (21-23), was found in the inflamed hearts and was elevated in skeletal muscle of chagasic mice (24). This suggests that this chemokine may be recruiting stem cells to the tissue as we observed increased number of Sca-1<sup>+</sup> cells in the peripheral blood of infected animals. Furthermore, within the population Sca-1<sup>+</sup> cells, was possible to observe two subpopulations with HSC and MSC profiles. Both populations are known to present CXCR4 on their surface (25).

The inflammatory infiltrate found in *T. cruzi*-infected mice is mainly composed by mononuclear cells. In fact, in addition to SDF-1, other chemokines, such as MCP 1, 2, and 3, are also expressed in the hearts of chagasic mice (24) and may recruit monocytes and lymphocytes. It has been recently shown that some monocyte subpopulations can differentiate into specialized cell types, such as endothelial cells, neurons, or cardiomyocytes (26-28). Thus, it is possible that monocytes are a sub-population participating in the generation of GFP<sup>+</sup> myocytes and endothelial cells observed in our study.

Skeletal muscle regeneration is a dynamic process that occurs with the contribution of different stem cells sources, including skeletal muscle side population cells, bone marrow-derived cells, mesoangioblasts and pericytes. These cells can contribute to the satellite cell

niche and generate myofibers. This process may additionally contribute to the generation of bone marrow-derived myocytes (29), such as the one observed herein.

The fusion process is a physiological mechanism by which myoblasts form multinucleated muscle fibers, becoming a syncytium. A previous study has demonstrated that macrophages play an important role in muscle regeneration (30) by producing growth factors for myogenic progenitors that can also undergo fusion with myofibers (31). Thus, since there is a potent mobilization of two different monocyte populations (Ly6C<sup>lo</sup> e Ly6C<sup>hi</sup>) and the presence of macrophages in the inflammatory foci, our data suggests that these cells are fusing with myocytes in our model of *T. cruzi* infection. Additionally, we found an increase in the production of IGF-1 and VEGF upon *T. cruzi* infection. These factors have been implicated in the promotion of tissue repair by angiogenesis induction and promote muscle regeneration, two processes in which macrophages have been shown to play key roles (32, 33).

Bone marrow-derived cells expressing satellite cell markers have been observed following bone marrow transplants in association with myofibers (34, 35). Camargo and co-workers (2003) also made this observation, although at a low frequency, after transplantation of hematopoietic stem cells in a cardiotoxin-induced injury model (31). In our study, we did not observe any bone marrow-derived cells (GFP<sup>+</sup>) expressing the satellite cell marker pax7, favoring a fusion process rather than a transdifferentiation mechanism, in this model of *T. cruzi* infection.

In conclusion, we have demonstrated that bone marrow cells actively participate in the pathogenesis and regeneration process that occurs naturally in damaged skeletal muscles and hearts in an experimental model of Chagas disease. These observations give support to the potential benefits of bone marrow cell therapy during the chronic phase of Chagas disease, in order to increase a regeneration process that naturally occurs.

### **Acknowledgements**

This work was supported by CNPq, FAPESB, FINEP, and FIOCRUZ. The authors wish to thank Geraldo Pedral Sampaio for technical assistance in flow cytometry.

## References

- 2.0 Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R (2006) The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* **22**, 583-588.
- 3.0 Coura JR, Dias JPC (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **104 (Suppl. I)**, 31-40.
- 4.0 Koberle F. (1968) Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* **6**, 63.
- 5.0 Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *Lancet* **375**, 1388-1402.
- 6.0 Andrade ZA (1983) Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. *Ciba Found. Symp.* **99**, 214-233.
- 7.0 Rassi A Jr, Dias JC, Marin-Neto JA, Rassi A. (2009) Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart* **95**, 524-534.
- 8.0 Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001) Bone marrow stromal cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* **19**, 180-192.
- 9.0 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705.
- 10.0 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, 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.
- 11.0 Cao F, Sun D, Li C, Narsinh K, Zhao L, Li X, Feng X, Zhang J, Duan Y, Wang J, Liu D, Wang H (2009) Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up. *Eur. Heart J.* **30**, 1986-1994.
- 12.0 Goldenberg RC, Jelicks LA, Fortes FS, Weiss LM, Rocha LL, Zhao D, Carvalho AC, Spray DC, Tanowitz HB (2008) Bone marrow cell therapy ameliorates and reverses chagasic cardiomyopathy in a mouse model. *J. Infect. Dis.* **197**, 544-547.
- 13.0 Soares MB, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, de Carvalho AC, Ribeiro-dos-Santos R (2004) Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am. J. Pathol.* **164**, 441-447.

- 14.0 Soares MB, Garcia S, Campos de Carvalho AC, Ribeiro dos Santos R (2007) Cellular therapy in Chagas' disease: potential applications in patients with chronic cardiomyopathy. *Regen. Med.* **2**, 257-264.
- 15.0 Jasmin, Jelicks LA, Koba W, Tanowitz HB, Mendez-Otero R, Campos de Carvalho AC, Spray DC (2012) Mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. Where do the cells go? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1971.
- 16.0 Lachtermacher S, Esporcatte BL, Fortes Fda S, Rocha NN, Montalvão F, Costa PC, Belem L, Rabischoffsky A, Faria Neto HC, Vasconcellos R, Iacobas DA, Iacobas S, Spray DC, Thomas NM, Goldenberg RC, de Carvalho AC (2012) Functional and transcriptomic recovery of infarcted mouse myocardium treated with bone marrow mononuclear cells. *Stem Cell Rev.* **8**, 251-261.
- 17.0 Corbel SY, Lee A, Lin Y, Duenas J, Brazelton TR, Blau HM, Rossi FMV (2003) Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat Med.* **9**, 1528-1532.
- 18.0 Rudnick MA (2003) Marrow to muscle, fusion versus fusion. *Nat. Med.* **9**, 1461-1462.
- 19.0 Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y (2005) Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* **309**, 314-317.
- 20.0 Marinho CR, Bucci DZ, Dagli ML, Bastos KR, Grisotto MG, Sardinha LR, Baptista CR, Gonçalves CP, Lima MR, Alvarez JM (2004) Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. *Infect Immun.* **72**, 2350-2357.
- 21.0 Federici EE, Abelman WH, Neva FA (1964) Chronic and progressive myocarditis and myositis in c3h mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **13**, 272-280.
- 22.0 Vandervelde S, Van-Luyn MJ, Tio RA, Harmsen MC (2005) Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **39**, 363-376.
- 23.0 Wojakowski W, Tendera M, Michałowska A, Majka M, Kucia M, Maślankiewicz K, Wyderka R, Ochała A, Ratajczak MZ (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.
- 24.0 Mieno S, Ramlawi B, Boodhwani M, Clements RT, Minamimura K, Maki T, Xu SH, Bianchi C, Li J, Sellke FW (2006) Role of stromal-derived factor-1alpha in the induction

- of circulating CD34+CXCR4+ progenitor cells after cardiac surgery. *Circulation* **114**, I186-I192.
- 25.0 Soares MB, de Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, dos Santos RR, Iacobas S, Goldenberg RC, Iacobas DA, Tanowitz HB, de Carvalho AC, Spray DC (2010) Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J. Infect. Dis.* **202**, 416-426.
- 26.0 Lau BW, Kane AB (2010) Sdf1/cxcl12 is involved in recruitment of stem-like progenitor cells to orthotopic murine malignant mesothelioma spheroids. *Anticancer Res.* **30**, 2153-2160.
- 27.0 Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Satoh T, Kawakami Y, Ikeda Y (2006) Endothelial differentiation potential of human monocyte-derived multipotential cells. *Stem Cells* **24**, 2733-2743.
- 28.0 Kodama H, Inoue T, Watanabe R, Yasuoka H, Kawakami Y, Ogawa S, Ikeda Y, Mikoshiba K, Kuwana M (2005) Cardiomyogenic potential of mesenchymal progenitors derived from human circulating CD14+ monocytes. *Stem Cells Dev.* **14**, 676-86.
- 29.0 Kodama H, Inoue T, Watanabe R, Yasutomi D, Kawakami Y, Ogawa S, Mikoshiba K, Ikeda Y, Kuwana M (2006) Neurogenic potential of progenitors derived from human circulating CD14+ monocytes. *Immunol. Cell. Biol.* **84**, 209-217.
- 30.0 Otto A, Collins-Hooper H, Patel K (2009) The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *J Anat.* **215**, 477-497.
- 31.0 Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057-1069.
- 32.0 Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA (2003) Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.* **9**, 1520-1527.
- 33.0 Lu H, Huang D, Ransohoff RM, Zhou L (2011) Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J.* **25**, 3344-3355.
- 34.0 Santini MP, Rosenthal N (2012) Myocardial regenerative properties of macrophage populations and stem cells. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **5**, 700-712.
- 35.0 Labarge MA, Blau HM (2002) Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* **111**, 589-601.

- 36.0 Dreyfus PA, Chretien F, Chazaud B, Kirova Y, Caramelle P, Garcia L, Butler-Browne G, Gherardi RK (2004) Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am. J. Pathol.* **164**, 773–779.



**Table 1. Acute infection with *T. cruzi* induces the mobilization of Sca-1<sup>+</sup> and monocytes to the peripheral blood**

| Cell subpopulation   | Uninfected   | Infected     | P value  |
|--|--------------|--------------|----------|
| MSC (Sca1 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup> ) | 0.23 ± 0.03  | 1.26 ± 0.18  | < 0.01   |
| HSC (Sca1 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> ) | 0.30 ± 0.06  | 1.71 ± 0.32  | < 0.05   |
| MNC F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> LY6C <sup>lo</sup> | 2.17 ± 0.20  | 42.70 ± 1.96 | < 0.0001 |
| MNC F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> LY6C <sup>hi</sup> | 10.90 ± 0.95 | 54.95 ± 1.93 | < 0.0001 |

Data represents the cell subpopulation % of naïve (n=3) and infected (n=8) mice and were expressed as means ± SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test. MSC: Mesenchymal stem cells; HSC: hematopoietic stem cells; MNC: Monocytes

## Figure legends

**Figure 1: Gene expression of chemokines in the heart and skeletal muscle.** Heart and skeletal muscle samples of uninfected or chagasic mice (33 days after infection) were removed and analyzed by qRT-PCR for the expression of SDF-1 and MCP 1, 2 and 3. Data represent the mean $\pm$ SEM of 5-8 mice per group. \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

**Figure 2: Generation of GFP<sup>+</sup> bone marrow chimeric mice.** Lethally irradiated wild-type C57BL/6 mice were transplanted with bone marrow obtained from C57BL/6 GFP transgenic mice.

**Figure 3: Infection of bone marrow chimeric mice with *T. cruzi*.** One month after transplantation, chimeric mice were infected with 100 Colombian strain *T. cruzi* and treated with benznidazole (bdz) 28 days later. (A) Blood parasitemia of *T. cruzi*-infected chimeric mice. Quantification of inflammation at various times after infection in the heart (B) and skeletal muscle (C) of chimeric mice. Data represent the mean $\pm$ SEM of 3-5 mice per group. \*\*\*  $P<0.001$ .

**Figure 4: Presence of GFP<sup>+</sup> cells in the hearts of chagasic chimeric mice.** Hearts of chimeric mice euthanized at different time points after infection with *T. cruzi* were analyzed by confocal microscopy. GFP<sup>+</sup> (green) myosin<sup>+</sup> (A) or F actin<sup>+</sup> (B-D) (red) cardiomyocytes were found in heart sections of mice after 33 (A), 60 (B), and 192 (C) days of infection. (D) Heart section of an uninfected chimeric mouse. Nuclei were stained with DAPI (blue).

**Figure 5: Presence of GFP<sup>+</sup> cells in skeletal muscle of chagasic chimeric mice.** Skeletal muscle of chimeric mice euthanized at different time points after infection with *T. cruzi* were analyzed by immunofluorescence microscopy. (A) Parasite nest within a GFP<sup>+</sup> myofiber (arrow) after 33 days of infection. (B and C) GFP<sup>+</sup> (green) myosin<sup>+</sup> (red) myofibers were found in skeletal muscle sections obtained from mice after 60 (B), and 192 (C) days of infection. (D) Skeletal muscle section obtained from an uninfected chimeric mouse. A rare GFP<sup>+</sup> cell is shown. Sections were stained with anti-myosin antibody (red) and DAPI (blue).

**Figure 6: Characterization of GFP<sup>+</sup> cells in different organs of *T. cruzi*-infected chimeric mice.** GFP<sup>+</sup> cells (green) were observed to be associated with blood vessels in the hearts of mice 33 days after infection (A), but not in uninfected chimeric mice (B). In red, staining for von Willebrand factor. Satellite cells pax7<sup>+</sup> in skeletal muscle sections of naïve (C) and *T. cruzi*-infected mice (D) 33 days after infection. Presence of GFP<sup>+</sup> (green) proliferating cells

(red) in the inflammatory infiltrates of heart (E) and skeletal muscle (F) tissue, 33 days post-infection. Nuclei were stained with DAPI (blue).

**Figure 7: Expression of IGF-1 and VEGF in the heart and skeletal muscle.** Naïve and *T. cruzi*-infected mice (33 days of infection) were euthanized to evaluate the gene expression of IGF-1 (A and C) and VEGF (B and D) by qRT-PCR. Data represent the mean±SEM of 5-8 mice per group. \* p<0.05.

Figure 1

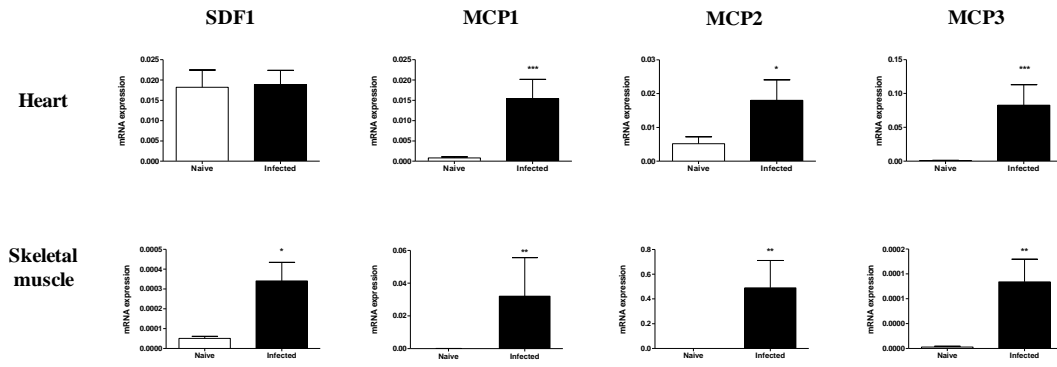


Figure 2

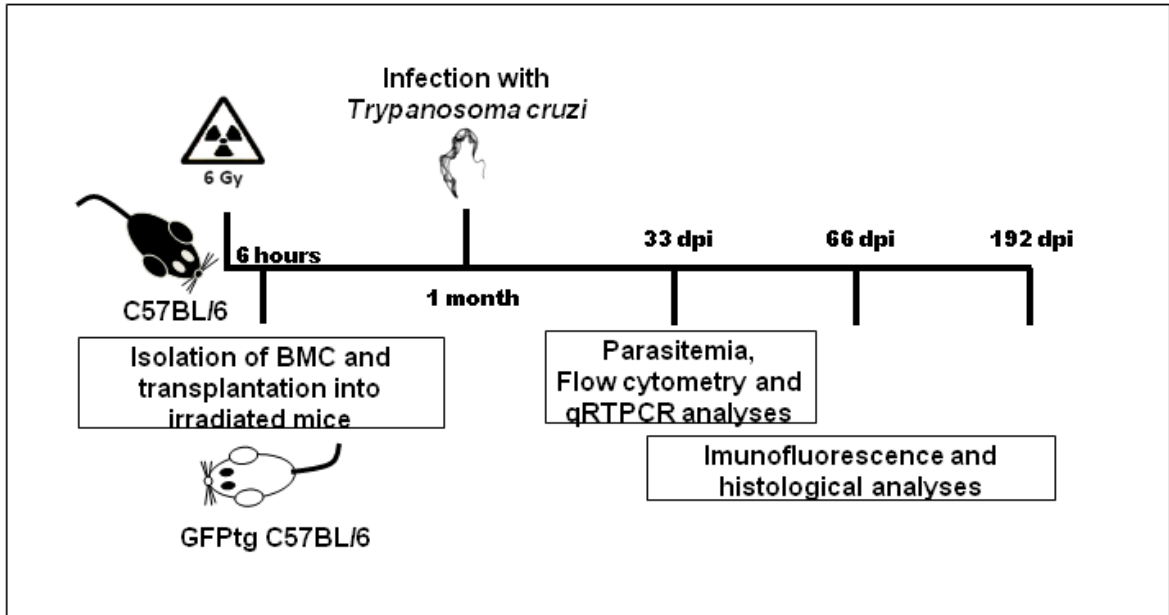


Figure 3

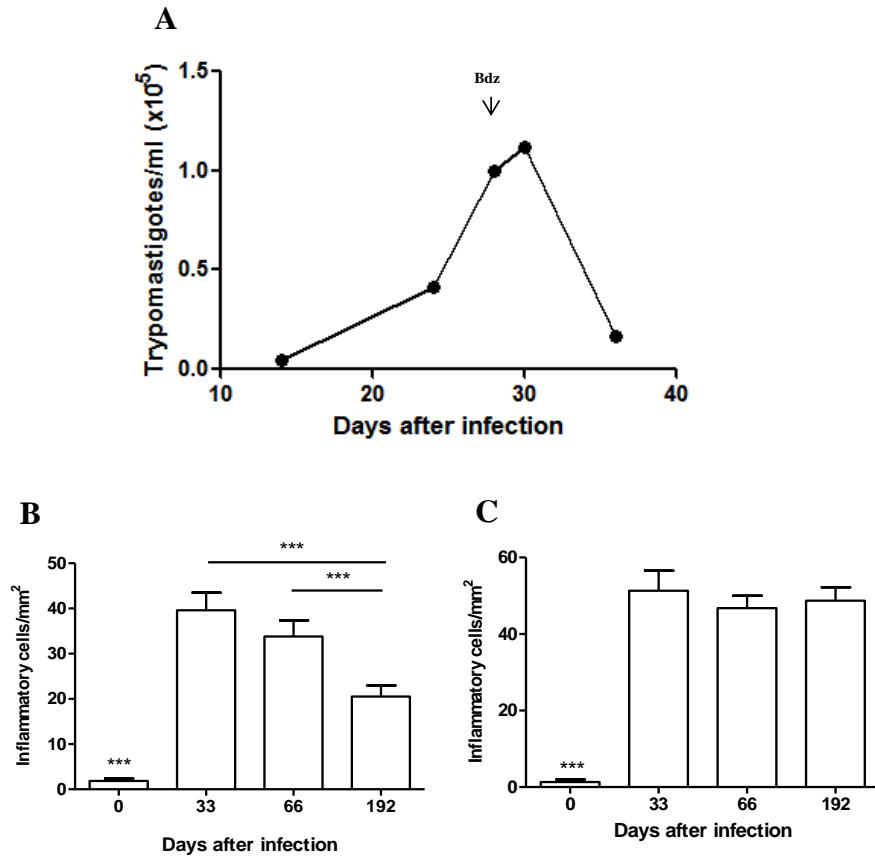


Figure 4

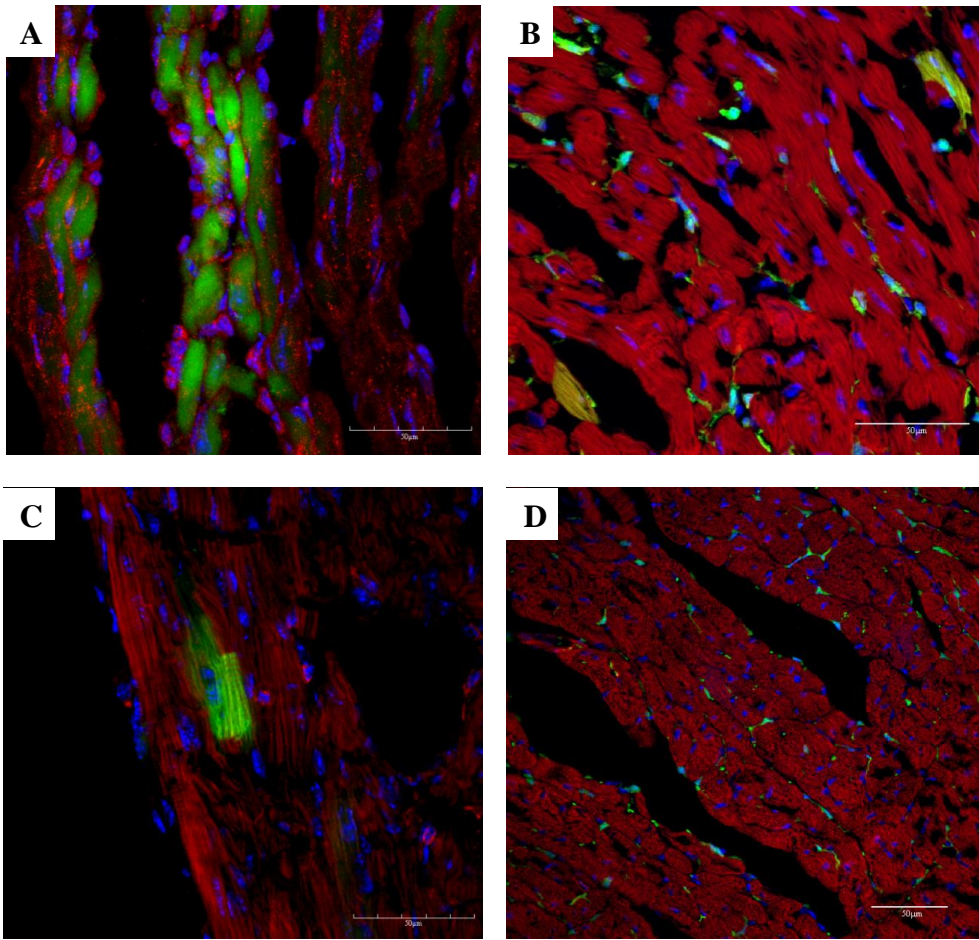


Figure 5

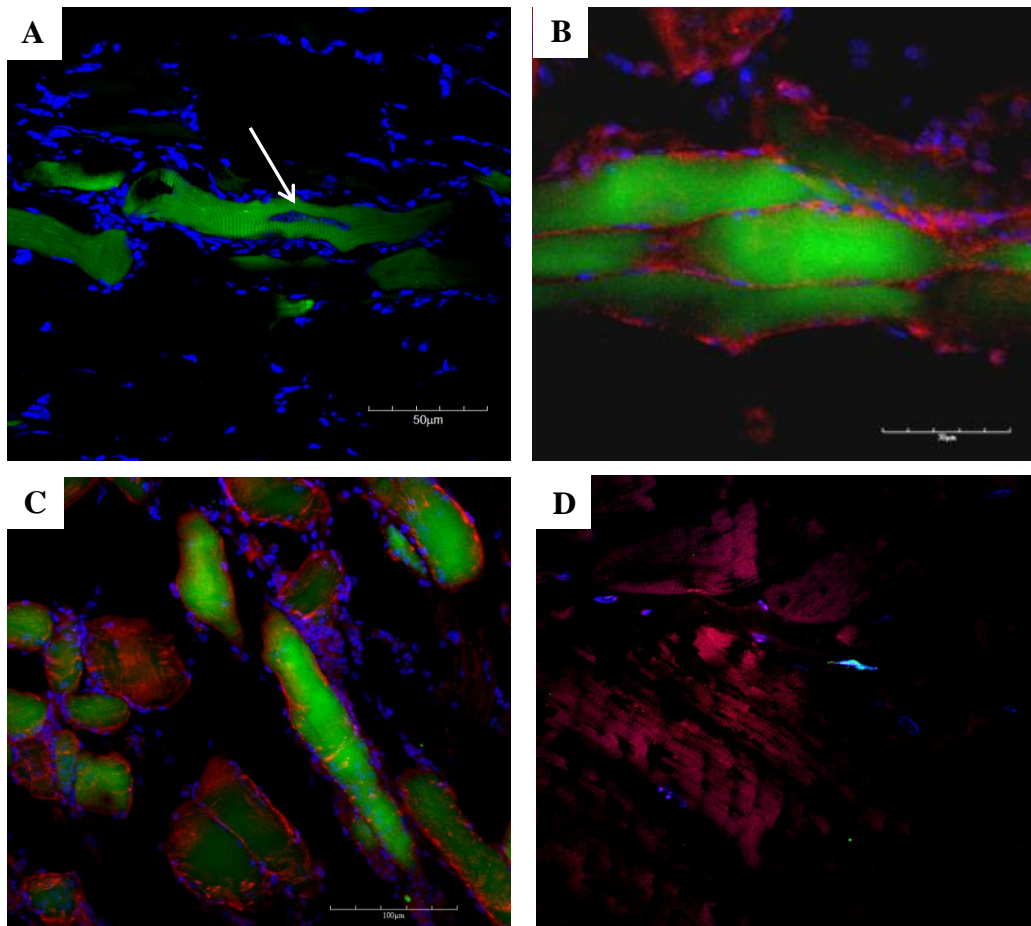




Figure 6

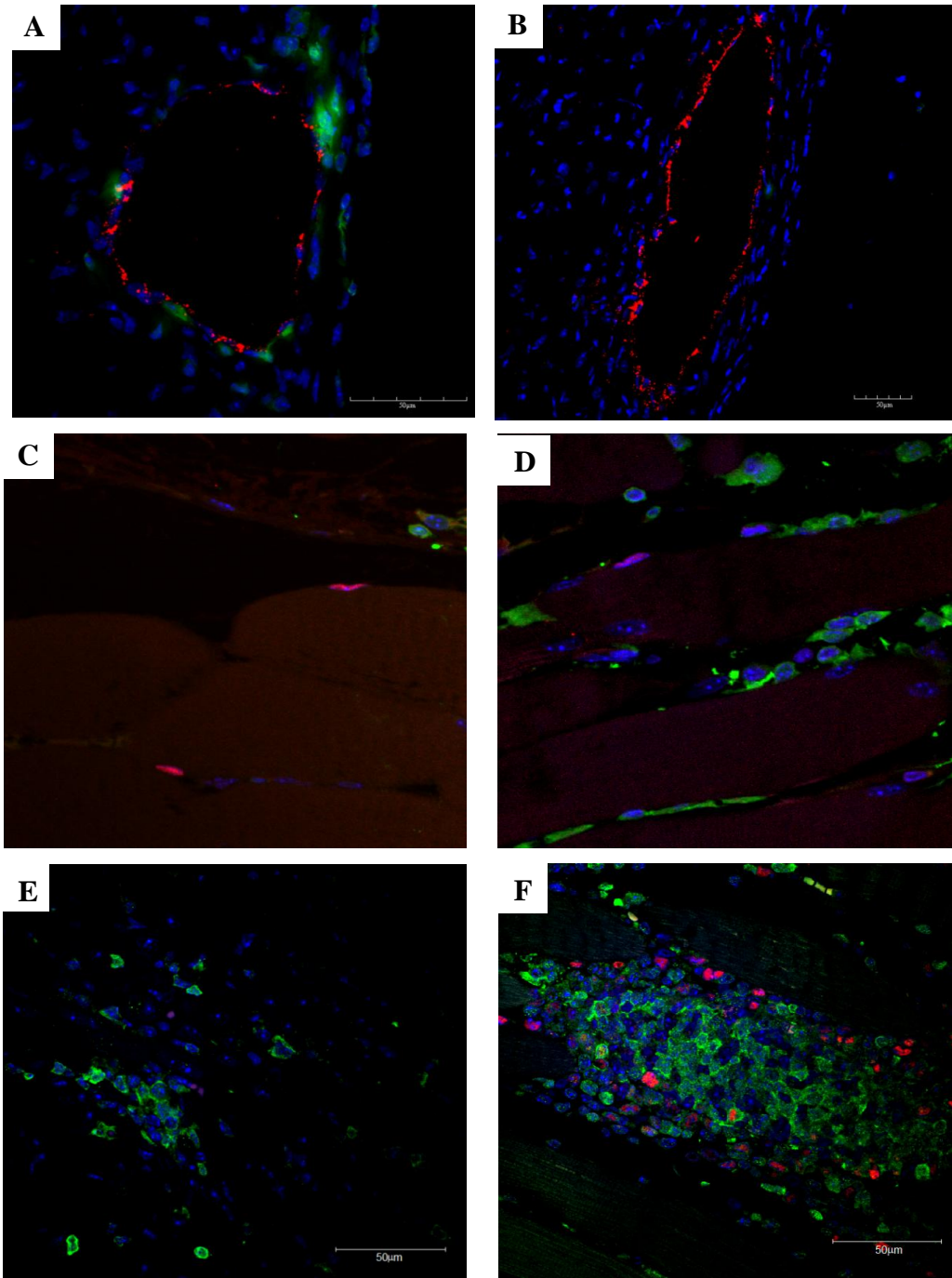
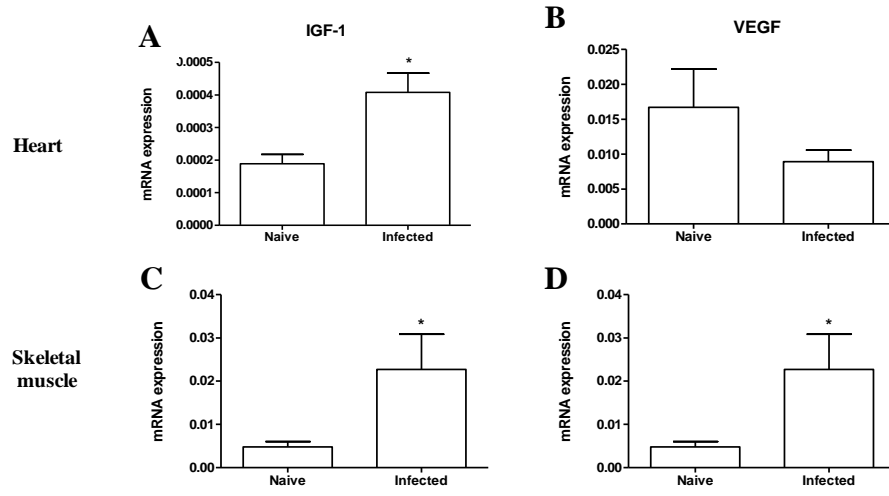


Figure 7



## 5.0 MANUSCRITO II

Neste trabalho nós caracterizamos as populações celulares derivadas da medula óssea presentes no sangue periférico de animais cronicamente infectados pelo *S. mansoni*. Em seguida, camundongos quiméricos foram gerados através de irradiação letal e reconstituição com células mononucleares de medula óssea de camundongos transgênicos GFP. Posteriormente, estes animais foram infectados pelo *S. mansoni* e eutanasiados na fase crônica para avaliação das células derivadas de medula óssea envolvidas na formação e regeneração das lesões.

BONE MARROW-DERIVED CELLS MIGRATE TO THE LIVER AND CONTRIBUTE TO THE GENERATION OF DIFFERENT CELL LINEAGES IN CHRONIC *SCHISTOSOMA MANSONI* INFECTION

Carine Machado Azevedo<sup>1,2</sup>, Bruno Solano de Freitas Souza<sup>1,2</sup>, Sheilla Andrade de Oliveira<sup>3</sup>, Elton Sá Barreto<sup>1</sup>, Hélio Almeida Neto<sup>1</sup>, Ricardo Ribeiro dos Santos<sup>2</sup>, Milena Botelho Pereira Soares<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Rua Waldemar Falcão, 121. Candeal 40296-710 - Salvador, BA – Brazil

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael. Av. São Rafael, 2152. São Marcos 41253-190 - Salvador, BA, Brazil.

<sup>3</sup>Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil.

**Correspondence to:** Milena B. P. Soares

Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael. Av. São Rafael, 2152. São Marcos 41253-190 - Salvador, BA, Brazil

Tel: 55 71 3281-6455, Fax: 55 71 3281-6489

E-mail: [milena@bahia.fiocruz.br](mailto:milena@bahia.fiocruz.br)

## ABSTRACT

Infection by *Schistosoma mansoni* causes inflammatory granulomatous response and liver fibrosis in the chronic phase. Although hepatic regeneration occurs mainly through the proliferation of hepatocytes, in some cases bone marrow-derived cells can also contribute for tissue regeneration. We have previously shown that transplanted bone marrow mononuclear cells contribute to fibrosis reduction in *S. mansoni* infected mice. Here we investigated the endogenous contribution of these cells to tissue repair in this experimental model of liver disease. *S. mansoni* infection led to increased numbers of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells in the peripheral blood when compared to uninfected controls. To investigate the migration and fate of BMC in the liver, we generated chimeric mice by transplanting BMC obtained from green fluorescent protein (GFP)-transgenic into lethally irradiated wild-type C57BL/6 mice. *S. mansoni*-infected chimeric mice did not present increased mortality when compared to wild-type infected mice and developed similar histological findings of those wild-type infected mice, with either isolated granulomas or periportal fibrosis. Bone marrow-derived GFP<sup>+</sup> cells were seen mainly in periportal regions, in collagen deposition areas. In the granulomas, a large number of CD45<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> cells were found. GFP<sup>+</sup> cells were also found in endothelia of hepatic vessels, as shown by co-expression of von Willebrand factor. However, rare  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> cells (fibrocyte-like) and bone marrow derived hepatocytes (GFP<sup>+</sup>) were found. In conclusion, BMC are recruited to the liver in *S. mansoni* infection and may contribute to the generation of different cell lineages involved not only in the pathogenesis of the disease, but also in the regeneration of the injured liver.

**Keywords:** Schistosomiasis, chimeric mice, bone marrow cells, tissue regeneration.

## INTRODUCTION

Schistosomiasis is the 4<sup>th</sup> most globally prevalent neglected tropical disease (HOTEZ et al., 2007) and represents an important cause of human liver fibrosis. The pathology of *Schistosoma mansoni* infection is associated with an inflammatory granulomatous response which includes macrophages, eosinophils and lymphocytes, induced by deposition of parasites eggs (WEINSTOCK; BOROS, 1983). The inflammatory response is an essential element in the initiation and progression of hepatic fibrosis. In this process, stellate cells play a key role (SENOO et al., 2010). The activation of this cell type is associated with a reduction of intracellular vitamin A storages, increased production of type I collagen and the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (SENOO et al., 2010). In addition to stellate cells, other cell types, including bone marrow-derived fibrocytes, have been associated with fibrogenesis (RUSSO et al., 2006).

Fibrosis deposition is the end result of most chronic liver diseases and, despite the fact that the mechanisms leading to its deposition and regression have been widely studied (IREDALE, 2007), there are no current treatments able to reduce fibrosis and accelerate the regeneration of the hepatic lesions (IWASAKO et al., 2012). Liver regeneration can occur through hepatocyte proliferation, activation of intra-hepatic progenitors known as oval cells, as well as bone marrow-derived cells (ECKERSLEY-MASLIN et al., 2009). The relative contribution of each one of these three compartments to liver regeneration and homeostasis may vary in different pathophysiological settings (WANG et al., 2003; JANG et al., 2004; MURACA et al., 2007; OH et al., 2007).

The understanding of the contribution of bone marrow cells to liver regeneration can bring important knowledge for the development of cell-based therapies. We have previously shown that transplantation of bone marrow mononuclear cells accelerates fibrosis regression naturally observed after treatment with anti-helminth drug in *S. mansoni*-infected mice (OLIVEIRA et al., 2008). In the present study we investigated the contribution of endogenous bone marrow-derived cells to the liver regeneration process in this parasitological experimental model by using bone marrow chimeric mice chronically infected with *S. mansoni*.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Six to eight weeks-old female C57BL/6 mice were used to form wild-type mice group (n=12) and as recipients for the production of chimeric animals (n=14). Four weeks-old male C57BL/6 mice transgenic for enhanced green fluorescent protein (GFP) were used as bone marrow cells donors for reconstitution of irradiated mice (n=14). All mice were raised and maintained at the animal facilities at the Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ/BA, and provided with rodent food 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.

#### *Generation of chimeric mice*

C57BL/6 female mice were irradiated with 6 Gy for depletion of the bone marrow cells in a <sup>137</sup>Cesium source irradiator (CisBio International, Codolet, France). Bone marrow cells were obtained from femurs and tibiae from male EGFP transgenic mice and used to reconstitute irradiated mice. The mononuclear cells were purified by centrifugation in Ficoll gradient at 1000 g for 15 minutes (Histopaque 1119 and 1077, 1:1; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). After two washings in DMEM medium (Sigma), the cells were filtered over nylon wool, resuspended in saline, and injected  $1 \times 10^7$  cells/mouse in a volume of 200  $\mu$ l intravenously in all irradiated mice. After 30 days of recovery, animals were infected with *S. mansoni*. Non-infected chimeric mice were used as controls Figure 1.

#### *Parasites and infection*

C57BL/6 chimeric and wild-type mice were infected by transcutaneous route with 30 *S. mansoni* cercariae of the Feira de Santana strain. This strain was maintained through successive passages in laboratory-raised *Biomphalaria glabrata* snails. Two weeks later the animals were exposed to reinfection with 15 cercariae to increase the hepatic injury. The infection was confirmed 40 days after the primary infection by parasitological exam of feces. Only mice presenting viable eggs in the stools were used.

#### *Morphological analysis*

Groups of animals were euthanized 4 months after infection. Morphological analysis was performed with formalin fixed and paraffin embedded livers. The sections obtained (5  $\mu$ m) were stained with either hematoxylin-eosin for histological analysis or picro sirius red to

visualize fibrosis by images obtained from a Scanscope digital slide scanner (Aperio, Vista, CA).

#### *Immunofluorescence analysis*

Ten  $\mu\text{m}$  frozen sections of livers were obtained and used for detection of GFP<sup>+</sup> cells. The following primary antibodies were used: rabbit anti-albumin (1:400, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark), rat anti-CD45 (1:200, BD, San Diego, CA), rabbit anti-collagen I (1:50, Novotec, Lyon, France), rabbit anti-cytokeratin 18 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA), rabbit anti-collagen IV (1:50, Novotec, Lyon, France), rabbit anti- GFAP (1:400, Dako), mouse anti- $\alpha$ -SMA (1:200, Dako ) stained using M.O.M. kit (Vector Labs, Burlingame, USA).. Secondary antibodies anti-rabbit IgG Alexa Fluor 568 conjugated (Molecular Probes, Carlsbad, USA ) and anti-rat IgG Alexa Fluor 568 conjugated (Molecular Probes) were used. For biotinylated anti- $\alpha$ -SMA stained sections, we used streptavidin Alexa Fluor 568-conjugated (Molecular Probes). Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Labs). Images were taken using a confocal microscope FluoView 1000 (Olympus, Tokyo, Japan). For quantification of EGFP<sup>+</sup> cells, 10 random fields per liver section were captured and automatically counted using the software Image Pro Plus v.7.0. (Media Cybernetics, Bethesda, USA).

#### *Flow cytometry analysis*

Quantitative analysis of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells was performed in peripheral blood of *S. mansoni*-chronically infected wild type mice (n = 7) and non-infected controls (n = 5) by flow cytometry. The cells were incubated 15 minutes at room temperature in the dark with the following rat anti-mouse conjugated antibodies from BD Biosciences (San Diego, USA). : Sca-1-FITC, CD90-PE, CD45-PerCP/Cy5.5, CD31-APC, CD34-FITC, CD44-APC and CD73-PE. Then red cells were lysate with lysis solution for 10 minutes, then washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of PBS. The acquisition was done using LSRFortessa (Becton Dickinson, San Diego, USA) cytometer and analysis was performed with software FACSDiva (version 6.1.3) from 10.000 events.

To confirm the presence of GFP<sup>+</sup> cells in chimeric mice, blood samples of irradiated and reconstituted mice were evaluated one month after transplantation. Blood samples



obtained from wild-type and GFP transgenic C57BL/6 mice were used as negative and positive controls, respectively. The acquisition was done using LSRFortessa (Becton Dickinson) cytometer and analysis was performed with software FACSDiva (version 6.1.3) from 10.000 events.

#### *Statistical analysis*

Results were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical comparisons between groups were performed by Student's t-test, using Prim Software (version 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Results were considered to be statistically significant when p was less than 0.05.

## **RESULTS**

### ***S. mansoni* chronic infection mobilizes bone marrow derived stem/progenitor cells to peripheral blood**

Wild type C57BL/6 mice were infected with *S. mansoni*, and, after 4 months, were assessed in order to evaluate whether chronic infection causes the mobilization of stem and precursor cells from the bone marrow to the peripheral blood. Chronic infection with *S. mansoni* lead to a statistically significant increase in the frequencies of mesenchymal stem cells (CD45<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>) and endothelial precursor cells (CD45<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>) in the peripheral blood when compared to uninfected controls (Table 1). The presence of hematopoietic stem cells, defined as CD45<sup>lo</sup>CD34<sup>+</sup>, was detected in the peripheral blood in similar frequencies in both infected and uninfected mice.

### **Chimeric mice chronically infected with *S. mansoni* present similar pathologic features to non-irradiated infected mice**

Chimeric mice were generated and infected with *S. mansoni* in order to evaluate the migration and fate of bone marrow derived cells (scheme shown in Figure 1). Infected chimeric mice did not present increased mortality when compared to non-irradiated infected mice (33% and 30%, respectively). Moreover, in order to evaluate if lethal irradiation could alter the development of the histological pattern expected for the experimental model, mice were euthanized four months after infection for morphological analysis. Liver sections of

chronically infected chimeric mice presented areas with scattered granulomas (Figures 2A-C) and periportal fibrosis (Figure D), similar to those observed in non-irradiated controls.

### **Migration and fate of bone marrow derived cells in the liver of chronically infected chimeric mice**

Bone marrow-derived cells were tracked in the liver by green fluorescence. Non-infected chimeras presented GFP<sup>+</sup> cells in association with sinusoids and larger vessels (Figure 3A). In contrast, GFP<sup>+</sup> cells were found predominantly in periportal areas, participating in the formation of inflammatory lesions observed in the liver 4 months after infection (Figure 3B). Chronic infection with *S. mansoni* significantly increased the number of GFP<sup>+</sup> cells in the liver, when compared to non-infected chimeric mice ( $p < 0.05$ ) (Figure 3C).

In addition, GFP<sup>+</sup> bone marrow-derived cells were frequently seen in association with collagen fibers, as shown by immunostaining for type I and IV collagens (Figures 4A-F). However, confocalized staining between collagen and GFP was not observed. In order to evaluate the presence of bone marrow-derived fibrocytes or myofibroblasts, liver sections were stained for  $\alpha$ SMA and GFAP. Rare GFP<sup>+</sup> cells co-expressing  $\alpha$ SMA<sup>+</sup>, a myofibroblast marker, were found inside granulomas (Figures 4G-I). Moreover, double-staining between GFAP, a marker for liver resident stellate cells, and GFP was not found (Figures 4K-L).

In chronically infected chimeric mice, GFP<sup>+</sup> cells composed the majority of the cells in granulomas, and a high expression of CD45, a pan leucocyte marker, was found in the cells located in the periphery (Figure 5A) as well as in the center of granulomas (Figure 5B). We also observed GFP<sup>+</sup> cells in the walls of blood vessels, forming endothelial cells (expressing von Willebrand factor) in both infected (Figure 5C) and non-infected (Figure 5D) chimeric animals. Rare GFP<sup>+</sup> hepatocyte-like cells were found in *S. mansoni*-infected (Figures 5E and F), but not in non-infected chimeric mice.

## **DISCUSSION**

The use of bone marrow chimeric mice has been a useful tool in the study of the pathogenesis of diseases and mechanisms of tissue regeneration (ALVAREZ-DOLADO et al.,

2003; LAGASSE et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2012). In the present study we demonstrated, for the first time, the recruitment and homing of bone marrow cells to the injured livers of mice chronically infected with *S. mansoni*. In this experimental model, bone marrow derived cells were found in blood vessels, in areas of fibrosis and, as expected, composed the substantial majority of the granuloma.

As previously seen in wild-type C57BL/6 mice (OLIVEIRA et al., 2008), chronically infected chimeric mice also presented areas with scattered granulomas or periportal fibrosis. The granuloma occurs around the *S. mansoni* eggs and involves different types of cells, such as eosinophils, macrophages, lymphocytes and fibroblasts. This injury starts within a blood vessel, usually a pre-capillary, where the eggs are deposited. Thus, the vascular endothelium is the first target lesion and responds to the stimulus with proliferation (ANDRADE; SANTANA, 2010). As shown before (LENZI; SOBRAL; LENZI, 1988), endothelial cells are present in large numbers in granuloma periovular schistosomotic and their proliferation is induced by soluble egg antigens (FREEDMAN; OTTESEN, 1988; LOEFFLER et al., 2002). In our study we observed a significant increase in endothelial progenitor cells in the peripheral blood of infected animals, as well as endothelial cells derived from bone marrow chimeras in livers of infected mice, suggesting a bone marrow contribution to the angiogenesis process that occurs in schistosomiasis. The formation of new vessels in this process may contribute not only to fibrogenesis, but also to fibrolysis previously described in schistosomiasis (ANDRADE; SANTANA, 2010). Therefore, bone marrow-derived cells may contribute to different aspects of disease establishment and tissue regeneration. The dynamic participation of bone marrow cells was also verified by the observation of inflammatory cells (CD45<sup>+</sup>) in the granuloma, which suggests a possible action of these cells in the elimination of debris and activation of fibrogenic mechanisms.

Although GFP<sup>+</sup> cells have been found in areas of collagen deposition, few bone marrow-derived cells were positive for  $\alpha$ -SMA, a marker widely used to characterize myofibroblasts, while GFP<sup>+</sup> cells co-expressing GFAP, a marker for liver resident stellate cells, was not observed. Myofibroblasts are the main source of extracellular matrix in the injured liver, but their origin is still debated (LEMOINNE et al., 2013). We observed the mobilization of mesenchymal stem cell into the peripheral blood of infected animals, suggesting that these cells may traffic from the bone marrow to the liver and participate in the process of fibrosis, although with a small contribution. This is in accordance with a previous study which showed that these cells not contribute significantly to collagen production

(HIGASHIYAMA et al., 2009). However, Russo et al.(2006) demonstrated the presence of bone marrow-derived myofibroblasts in the fibrotic liver.

Bone marrow-derived hepatocytes, although rare, were only found in chimeric mice infected with *S. mansoni*. Similarly, in a previous study we observed in chimeric animals with chronic liver injury induced by CCl<sub>4</sub> administration, few cells co-expressing GFP and albumin in the hepatic parenchyma, while none was found in non-injured controls (OLIVEIRA et al., 2012). The finding of bone marrow-derived hepatocytes has been previously explained both by the occurrence of cell fusion or transdifferentiation. In the fusion process, stem cells are fused with injured hepatocytes and undergo gene reprogramming to express specific proteins of the resident cells with which the fusion occurred (VASSILOPOULOS; WANG; RUSSELL, 2003). Most studies that suggests the occurrence of fusion processes used mice deficient for the enzyme fumarylacetoacetate hydrolase (*Fah*<sup>-/-</sup>) as an experimental model that simulates the tyrosinemia type I (VASSILOPOULOS; WANG; RUSSELL, 2003; WANG et al., 2003; WILLENBRING et al., 2004). In this model there is a high pressure proliferative of hepatocytes (FAUSTO, 2004) and seems to favor the chromosomal instability which can contribute to fusion (JANG et al., 2004). In contrast, in vitro (JANG et al., 2004) and in vivo (THEISE et al., 2000; JANG et al., 2004) studies have demonstrated the transdifferentiation of bone marrow cells by cytogenetic analysis of chromosomes X and Y and expression of hepatocyte-specific markers such as albumin. In our study we cannot say which process occurred because no analysis was performed to clarify this, but we can assume that its relevance in schistosomiasis might be limited by the extremely low occurrence of this event found in the present study.

Independently of the fate of cells, a previous study demonstrated bone marrow mononuclear cells inside granulomas areas 5 days after transplantation and in the hepatic parenchyma co-expressing albumin 2 months after transplantation. The mice also had a reduction in fibrosis and granuloma area (OLIVEIRA et al., 2008). By using another chronic hepatic injury model induced by CCl<sub>4</sub>, (OLIVEIRA et al., 2012) we showed a reduction of fibrosis and inflammatory cell numbers, reinforcing that BMC therapy can be useful for treating hepatic injury.

In conclusion, our results indicate that bone marrow-derived cells are recruited to the liver in chronic experimental infection by *Schistosoma mansoni* and actively participate in the tissue homeostasis after liver injury in this model. Bone marrow derived cells are able to give rise to hepatocytes, inflammatory cells of the granuloma and stromal cells such as endothelial

cells and fibrocytes. Further studies are needed to clarify their roles both in the pathogenesis and in regeneration of the injured liver.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by CNPq, FAPESB, FINEP, and FIOCRUZ. The authors wish to thank Geraldo Pedral Sampaio for technical assistance in flow cytometry.

## REFERENCES

- ANDRADE, Z. A.; SANTANA, T. S. Angiogenesis and schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 105, n. 4, Jul, p. 436-439, 2010.
- DE OLIVEIRA, S. A. et al. Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. Cytotherapy, v. 14, n. 3, Mar, p. 339-349, 2012.
- ECKERSLEY-MASLIN, M. A. et al. Bone marrow stem cells and the liver: Are they relevant? J Gastroenterol Hepatol, v. 24, n. 10, Oct, p. 1608-1616, 2009.
- FAUSTO, N. Liver regeneration and repair: Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. Hepatology, v. 39, n. 6, Jun, p. 1477-1487, 2004.
- FREEDMAN, D. O.; OTTESEN, E. A. Eggs of schistosoma mansoni stimulate endothelial cell proliferation in vitro. J Infect Dis, v. 158, n. 3, Sep, p. 556-562, 1988.
- HIGASHIYAMA, R. et al. Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. Gastroenterology, v. 137, n. 4, Oct, p. 1459-1466 e1451, 2009.
- HOTEZ, P. J. et al. Control of neglected tropical diseases. N Engl J Med, v. 357, n. 10, Sep 6, p. 1018-1027, 2007.
- IREDALE, J. P. Models of liver fibrosis: Exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. J Clin Invest, v. 117, n. 3, Mar, p. 539-548, 2007.
- IWAISAKO, K.; BRENNER, D. A.; KISSELEVA, T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. J Gastroenterol Hepatol, v. 27, Suppl. 2, p. 65-68, 2012.
- JANG, Y. Y. et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. Nat Cell Biol, v. 6, n. 6, Jun, p. 532-539, 2004.
- LEMOINNE, S. et al. Origins and functions of liver myofibroblasts. Biochim Biophys Acta, v. 1832, n. 7, Jul, p. 948-954, 2013.
- LENZI, H. L.; SOBRAL, A. C.; LENZI, J. A. Participation of endothelial cells in murine schistosomiasis. Braz J Med Biol Res, v. 21, n. 5, p. 999-1003, 1988.

LOEFFLER, D. A. et al. Soluble egg antigens from schistosoma mansoni induce angiogenesis-related processes by up-regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J Infect Dis, v. 185, n. 11, Jun 1, p. 1650-1656, 2002.

MURACA, M. et al. Liver repopulation with bone marrow derived cells improves the metabolic disorder in the gunn rat. Gut, v. 56, n. 12, Dec, p. 1725-1735, 2007.

OH, S. H. et al. Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. Gastroenterology, v. 132, n. 3, Mar, p. 1077-1087, 2007.

OLIVEIRA, S. A. et al. Therapy with bone marrow cells reduces liver alterations in mice chronically infected by schistosoma mansoni. World J Gastroenterol, v. 14, n. 38, Oct 14, p. 5842-5850, 2008.

RUSSO, F. P. et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. Gastroenterology, v. 130, n. 6, May, p. 1807-1821, 2006.

SENOO, H. et al. Hepatic stellate cell (vitamin a-storing cell) and its relative--past, present and future. Cell Biol Int, v. 34, n. 12, Dec, p. 1247-1272, 2010.

THEISE, N. D. et al. Liver from bone marrow in humans. Hepatology, v. 32, n. 1, Jul, p. 11-16, 2000.

VASSILOPOULOS, G.; WANG, P. R.; RUSSELL, D. W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. Nature, v. 422, n. 6934, Apr 24, p. 901-904, 2003.

WANG, X. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. Nature, v. 422, n. 6934, Apr 24, p. 897-901, 2003.

WEINSTOCK, J. V.; BOROS, D. L. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. J Immunol, v. 130, n. 1, Jan, p. 418-422, 1983.

WILLENBRING, H. et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. Nat Med, v. 10, n. 7, Jul, p. 744-748, 2004.

WYNN, T. A.; BARRON, L. Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis. Semin Liver Dis, v. 30, n. 3, Aug, p. 245-257, 2010.



**Table 1. Chronic infection with *S. mansoni* induces the mobilization of MSC and EPC to the peripheral blood.**

| <b>Cell subpopulation</b>  | <b>Naive</b> | <b>Infected</b> | <b><i>p</i> value</b> |
|--|--------------|-----------------|-----------------------|
| CD45 <sup>+</sup> Sca-1 <sup>+</sup> CD73 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> | 0.18 ± 0.04  | 2.54 ± 0.40     | 0.0004                |
| CD45 <sup>+</sup> Sca-1 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> | 0.02 ± 0.004 | 0.08 ± 0.01     | 0.0034                |
| CD45 <sup>lo</sup> CD34 <sup>+</sup>                                     | 1.02 ± 0.21  | 1.75 ± 0.26     | 0.065                 |

Data represent cell subpopulations % of 5 naïve and 7 infected mice and were expressed as means ± SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test.

## Figure legends

**Figure 1: A schematic illustration of the experimental design.** C57BL/6 wild-type mice were infected with *S. mansoni* cercariae and euthanized 4 months after infection for peripheral blood analysis by flow cytometer. In parallel, naïve C57BL/6 female mice were used to generate chimeric mice. Animals were irradiated and transplanted with BMC obtained from GFP<sup>+</sup> donors (10<sup>7</sup> cells/mouse). Chimeric mice were infected with *S. mansoni* and euthanized 4 months later. Control chimeric mice were evaluated at the same time points.

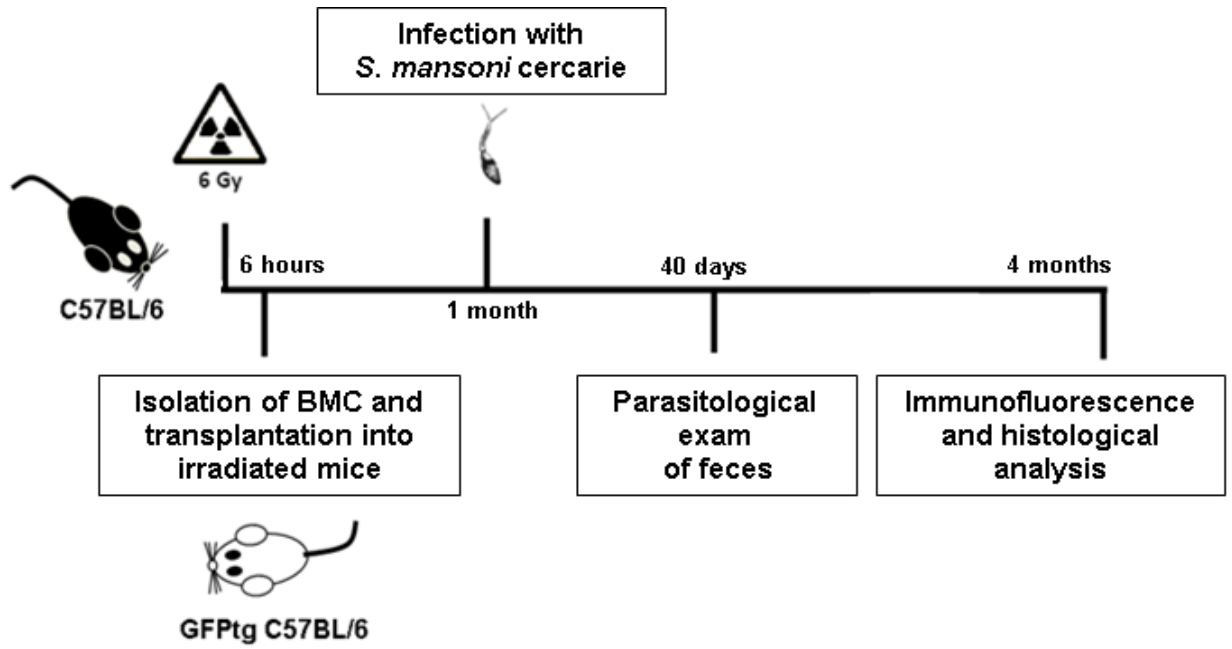
**Figure 2: Chronic infection histological patterns of chimeric mice.** Liver sections of chronically infected chimeric mice present areas with scattered granulomas (**A** and **B**) or periportal fibrosis (**C** and **D**). Animals were sacrificed 4 months after infection and liver sections were stained with H&E (**A** and **B**) or picrosirius red to visualize fibrosis (**C** and **D**).

**Figure 3: Migration of GFP<sup>+</sup> cells to the liver of infected mice.** Liver sections of non-infected (**A**) and infected (**B**) chimeric mice were analyzed to evaluate the influx of GFP<sup>+</sup> (green) cells (**A**). Sections were co-stained with CK-18 (red) and DAPI (nuclei in blue). **C**, Quantification of GFP<sup>+</sup> cells/area. \*\*\*, p<0.0001.

**Figure 4: Distribution of bone marrow-derived cells in liver of infected chimeric mice.** GFP<sup>+</sup> cells (green) were found within fibrotic areas. GFP<sup>+</sup> cells in fibrosis area confirmed with collagen I (red; **A-C**) or collagen IV (red; **D-F**) staining. **G-I**, Most GFP<sup>+</sup> cells do not express the myofibroblast marker  $\alpha$ SMA (red). Arrow indicates a GFP<sup>+</sup>  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> cell. **J-L**, GFP<sup>+</sup> cells do not express the stellate cell marker GFAP (red). Nuclei were stained with DAPI (blue).

**Figure 5: Presence of different cell types involved in liver injury and tissue repair derived from bone marrow cells.** GFP<sup>+</sup> cells (green) co-stained with CD45 (red) in periphery (**A**) and in the center (**B**) of granulomas. GFP<sup>+</sup> cells co-stained with wVF (red), an endothelial cell marker, in infected (**C**) and non infected (**D**) chimeric animals. **E** and **F**, Bone marrow-derived GFP<sup>+</sup> hepatocytes (green) co-stained with albumin (red; **F**). Nuclei were stained with DAPI (blue).

Figure 1



**Figure 2**

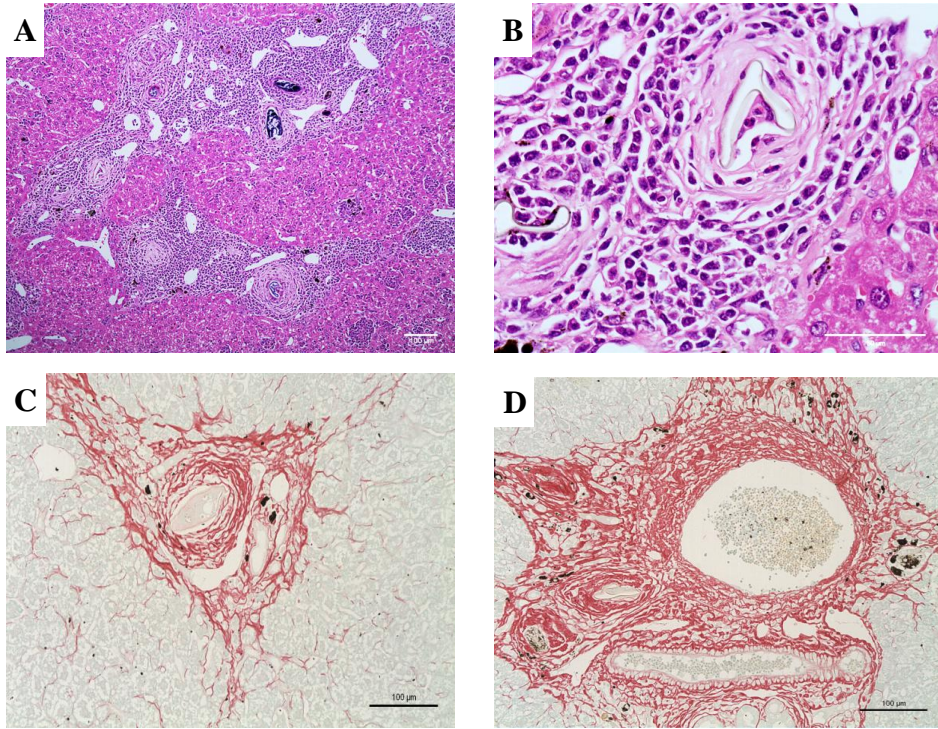


Figure 3

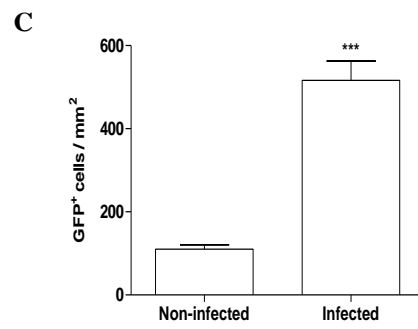
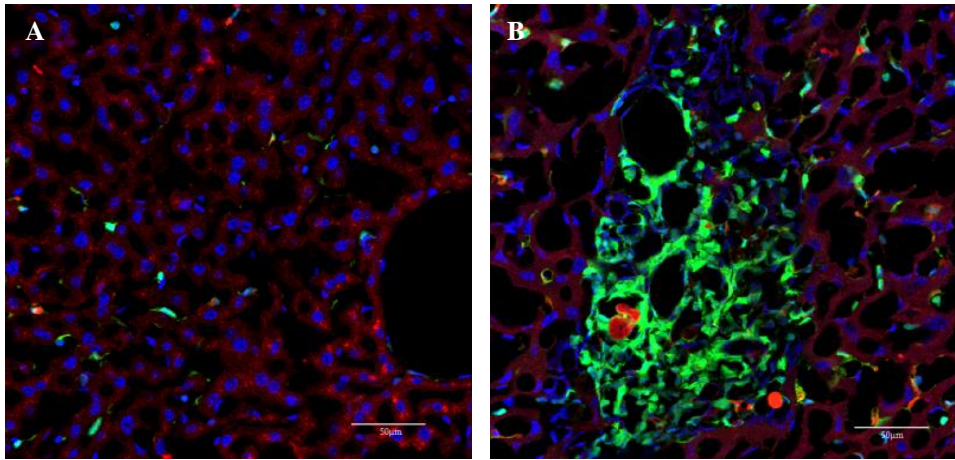




Figure 4

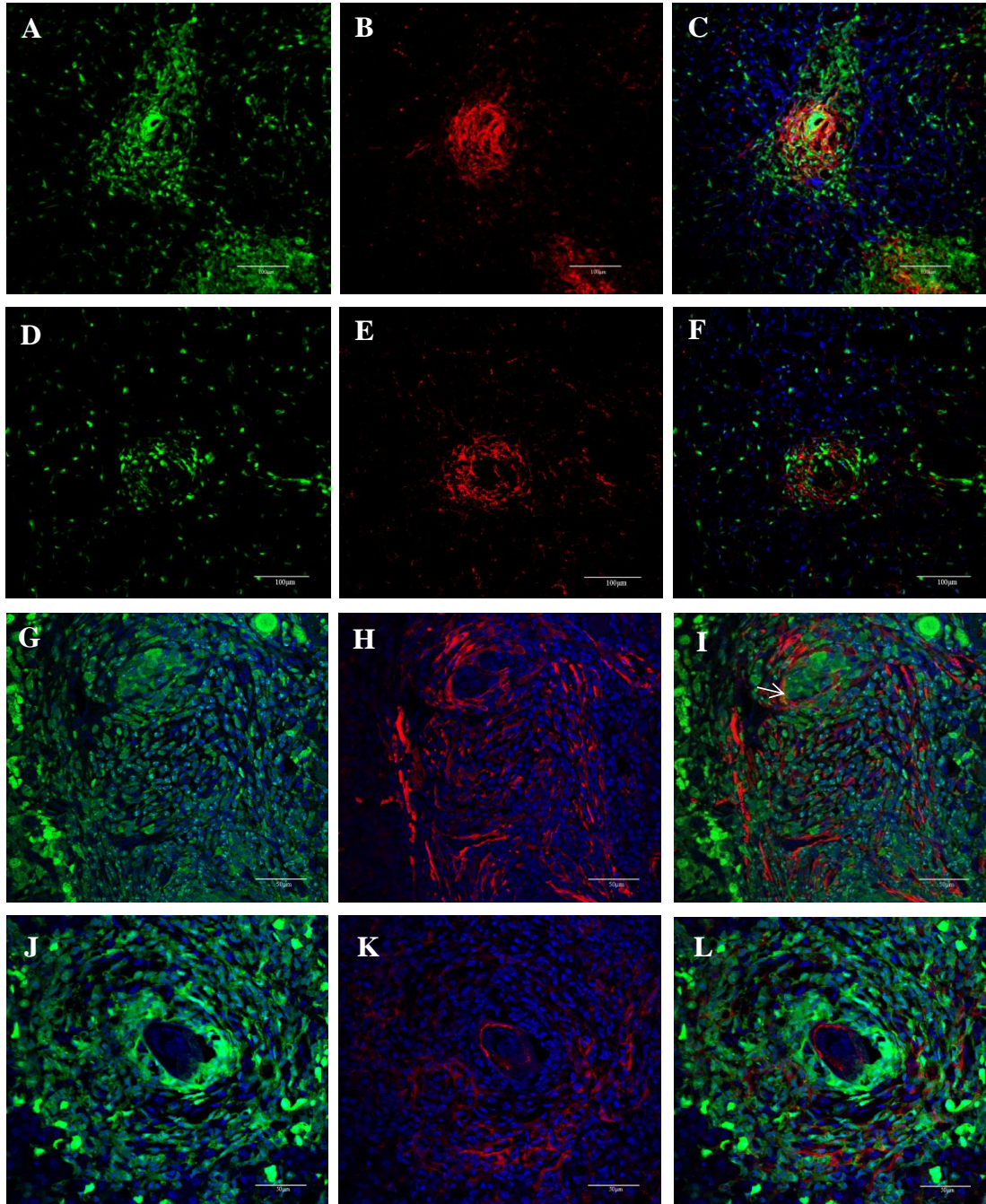
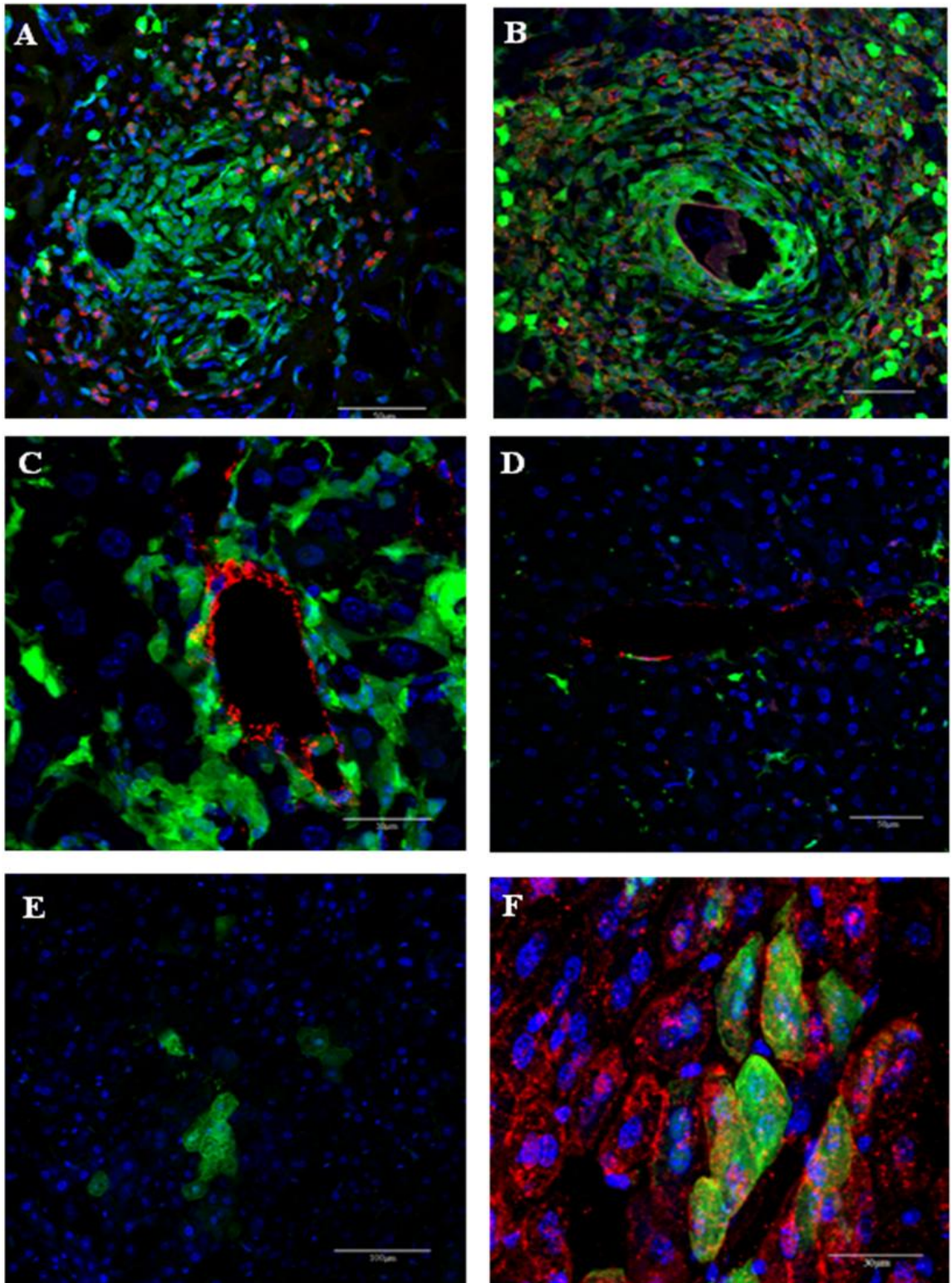


Figure 5





## 6.0 DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado a contribuição das células de medula óssea no processo de reparo tecidual em diferentes modelos de lesão (CAMARGO et al., 2003; VASSILOPOULOS; WANG; RUSSELL, 2003; MURACA et al., 2007). No entanto, tal contribuição parece variar de acordo com os mecanismos envolvidos na formação e na resolução de cada doença. Nosso grupo demonstrou previamente que células mononucleares de medula óssea contribuem para a regeneração tecidual na fase crônica da doença de Chagas (SOARES et al., 2004), esquistossomose (OLIVEIRA et al., 2008) e cirrose induzida por CCl<sub>4</sub> (OLIVEIRA et al., 2012). Entender como as células de medula óssea naturalmente participam nesses modelos de lesão inflamatória crônica pode promover o uso terapêutico mais eficiente destas células.

No presente trabalho, nós observamos, em ambos os modelos de lesão utilizados, células parenquimatosas GFP<sup>+</sup> co-marcadas com marcadores específicos de cada tecido (tais como miosina e albumina) apenas nos animais quiméricos infectados, enquanto que nos controles não infectados poucas células GFP<sup>+</sup> foram vistas e não possuíam características morfológicas de cardiomiócitos, miócitos ou hepatócitos.

Dois mecanismos, não mutuamente exclusivos, podem explicar estes achados: fusão e transdiferenciação. Na fusão, as células-tronco se fundem com as células do tecido lesionado e passam por um processo de reprogramação genética para expressar proteínas específicas das células com as quais se fundiram (ALVAREZ-DOLADO et al., 2003; VASSILOPOULOS; WANG; RUSSELL, 2003). Já na transdiferenciação, as células-tronco se diferenciam em células diferentes de sua linhagem original (VIEYRA et al., 2005). Estudos tem demonstrado a ocorrência de ambos os processos em diferentes tecidos, conforme descrito abaixo.

Vassilopoulos; Wang; Russell (2003), utilizando o modelo de tirosinemia tipo I em camundongos deficientes da enzima fumarilacetoacetato hidrolase (Fah<sup>-/-</sup>), observaram nódulos de regeneração hepática que expressavam Fah quatro meses após reconstituição da medula destes animais com células de medula óssea de camundongos selvagens (Fah<sup>+/+</sup>). Além disso, os valores de poliploidia encontrado nos hepatócitos foram condizentes com o esperado para um processo de fusão (4n, 6n, 10n e 18n). Wang et al. (2003); Willenbring et al. (2004), também sugeriram a ocorrência de fusão após o transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSC) de fêmeas Fah<sup>+/+</sup> em camundongos machos Fah<sup>-/-</sup>, uma vez que foram encontrados cromossomos Y em células Fah<sup>+</sup>. Este modelo parece favorecer a



instabilidade cromossômica, o que pode contribuir para a ocorrência do processo de fusão (JANG et al., 2004).

Por outro lado, também existem evidências para a ocorrência de transdiferenciação de HSC em hepatócitos. De acordo com Jang et al. (2004), quando as HSC são co-cultivadas com hepatócitos obtidos de camundongos com lesão hepática aguda induzida por CCl<sub>4</sub> ou apenas com o sobrenadante da cultura de hepatócitos lesionados, estas células gradativamente diminuem a expressão do marcador hematopoiético CD45, aumentam a expressão dos marcadores hepáticos citoqueratina 18 e albumina e passam a expressar fatores de transcrição hepáticos e proteínas citoplasmáticas como  $\alpha$ FP, GATA4, HNF4, HNF3 e HNF1. Neste mesmo trabalho, as HSC de machos foram transplantadas em camundongos fêmeas após irradiação e administração de uma dose de CCl<sub>4</sub> e encontrou-se 7,6% do total de células do fígado derivadas das HSC uma vez que apresentaram genótipo XY ou XYXY e expressavam marcadores como E-caderina e albumina.

Em outro estudo, Theise et al. (2000), observaram em camundongos quimeras de medula óssea com lesão hepática leve induzida pela irradiação, uma frequência de 0,76% a 2,2% de hepatócitos derivados da medula (células nas quais se detectou cromossomo Y e albumina) 2 a 6 meses após o transplante. Os autores atribuíram o achado a um processo de transdiferenciação das células de medula óssea. No entanto, apenas a marcação do cromossomo Y não distingue se houve fusão ou transdiferenciação, é necessário observar também os cromossomos X.

No presente estudo, nós não encontramos hepatócitos derivados da medula óssea nos animais apenas irradiados que não foram infectados pelo *S. mansoni*. Entretanto, no grupo infectado alguns hepatócitos GFP<sup>+</sup> foram encontrados, porém não podemos afirmar qual processo originou os mesmos. A baixa frequência de hepatócitos GFP<sup>+</sup> encontrada pode ser devida a uma limitação do modelo, uma vez que a expressão de GFP nos hepatócitos dos camundongos transgênicos é baixa. Dessa forma, a visualização da fluorescência dos hepatócitos derivados da medula nos animais quiméricos pode ter sido prejudicada. Outra possibilidade é que a contribuição da medula seja realmente pequena, uma vez que a capacidade de regeneração do fígado se dá principalmente pela proliferação dos hepatócitos.

O modelo experimental no qual hepatócitos derivados da medula óssea são encontrados com maior frequência é o que utiliza camundongos transgênicos Fah<sup>-/-</sup>. Neste modelo, há uma alta pressão proliferativa dos hepatócitos e parece ocorrer principalmente o

processo de fusão celular, pois a alta frequência de hepatócitos derivados de medula parece ser alcançada apenas por este processo que gera hepatócitos tetraplóides, 6X e aneuplóides comumente encontrados neste modelo (FAUSTO, 2004).

No adulto, o crescimento e o reparo das fibras musculares esqueléticas ocorrem através da diferenciação de células mononucleares progenitoras miogênicas chamadas células satélites (FERRARI, 1998). Estas células estão localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática da miofibrila adulta (MAURO, 1961 *apud* LABARGE; BLAU, 2002; XYNOS et al., 2010). No entanto, o potencial de auto-renovação das células satélites adultas é limitado, diminui com a idade e pode ser exaurido no caso de uma lesão muscular crônica (FERRARI, 1998). Neste caso, as células de medula óssea podem contribuir para o reparo muscular por diferentes processos, tais como fusão e transdiferenciação.

Em nosso modelo, observamos a formação de miofibrilas a partir de células derivadas da medula (miofibrilas co-marcadas para miosina e GFP). Mesmo não utilizando nenhuma técnica para avaliar através de qual processo as células da medula originaram as miofibrilas, a diferença de intensidade de fluorescência GFP<sup>+</sup> parece ser devida à fusão de miofibrilas com diferentes números de células GFP<sup>+</sup> que podem ser células-tronco ou macrófagos. Estudos prévios têm demonstrado que os macrófagos participam no reparo de músculo esquelético e produzem fatores de crescimento para células miogênicas (ARNOLD et al., 2007). Além disso, podem ficar aprisionados no processo fusogênico do músculo esquelético, como sugerido por Camargo et al. (2003), o que pode explicar a presença de miofibrilas GFP<sup>+</sup> em nosso estudo, já que as células do infiltrado inflamatório são derivadas da medula e dentre estas estão os macrófagos. Adicionalmente, observamos o aumento de duas populações de monócitos (Ly6C<sup>lo</sup> e Ly6C<sup>hi</sup>) no sangue periférico dos animais chagásicos, que de acordo com Arnold et al. (2007), são recrutadas para o músculo lesionado e apresentam funções diferentes, com perfil anti-inflamatório e inflamatório, respectivamente. Nesse mesmo estudo, Arnold et al., observaram que os macrófagos Ly6C<sup>lo</sup> proliferam no local da lesão. Nós encontramos células PCNA<sup>+</sup> (marcador de proliferação celular) no infiltrado inflamatório do músculo lesionado que podem ser macrófagos.

De acordo com Camargo et al. (2003), o processo de fusão é um mecanismo fisiológico pelo qual mioblastos formam fibras musculares multinucleadas. Neste caso, o resultado final de fusão ou transdiferenciação é a formação de um sincício de fibra muscular. Estes autores observaram a formação de fibras musculares numa baixa frequência (0,03% a

0,076%) 9 meses após o transplante de HSC (CD45<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>) em camundongos com lesão induzida por cardiotoxina. Além disso, encontraram células satélites derivadas da medula numa frequência extremamente baixa, sugerindo que as miofibras derivadas da medula são originadas por fusão. Outra possibilidade é que as células de medula óssea também podem contribuir para a formação de miofibras através da diferenciação por uma via independente de pax7 (fator de transcrição que é expresso em células satélites e mioblastos em proliferação) e MyoD como observado por Xynos et al. (2010) utilizando camundongos irradiados para ablação da medula e transplantados com células de medula óssea (CD45<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>) de camundongos transgênicos Pax7<sup>-/-</sup> ou MyoD<sup>-/-</sup>. Os autores observaram a mesma frequência da formação de fibras derivadas de células da medula nestes animais ou nos controles transplantados com células de camundongos selvagens. Portanto, mesmo que células Pax7<sup>+</sup> derivadas da medula não tenham sido encontradas em nosso estudo, a possibilidade de diferenciação por uma via que não envolve a formação de células satélites não pode ser descartada.

Diferentemente, de acordo com LaBarge; Blau (2002), a irradiação para ablação da medula (9,6 Gy) causa também ablação de células satélites, induzindo o recrutamento de BMC para ocupar este nicho de células satélites. Estes autores observaram 2 a 6 meses após a reconstituição da medula óssea com células GFP<sup>+</sup>, que estas foram encontradas no músculo esquelético expressando marcadores específicos de células satélites como Myf-5 (fator de transcrição crítico para iniciar o programa miogênico em células satélites) e cMet-R (receptor de tirosina quinase usado como marcador de células satélites) numa frequência de 0,37 células/fibra ou 5% em média. Apesar disso, raras fibras GFP<sup>+</sup> (1 em 1589) foram encontradas nos animais irradiados neste estudo. Similarmente em nosso estudo, não foram encontradas fibras GFP<sup>+</sup> nos animais quimeras não infectados. No entanto, não encontramos nenhuma célula satélite GFP<sup>+</sup>, isso pode ser explicado pela dose mais baixa de radiação gama (600 rad) que nós utilizamos. Neste mesmo trabalho de LaBarge; Blau (2002), quando os animais irradiados e transplantados foram submetidos a exercício físico (corrida numa esteira) para produzir lesão muscular, o número de fibras GFP<sup>+</sup> aumentou 20 vezes em relação aos animais não submetidos a exercício (0,16% para 3,52%). Em nosso estudo, encontramos fibras GFP<sup>+</sup> apenas nos animais infectados. A frequência relativamente alta de miofibras GFP<sup>+</sup> encontrada no nosso estudo em relação aos relatos da literatura, talvez seja devido ao modelo utilizado no qual o estímulo lesivo é persistente. Este fato pode favorecer uma contribuição maior das células de medula óssea, uma vez que a capacidade de regeneração

através das células satélites é limitada. A maioria dos estudos relatados na literatura, contudo, utiliza modelos em que o estímulo lesivo (injeção de cardiotoxina ou miotoxina) é retirado após a indução da lesão.

As células de medula óssea também são capazes de originar cardiomiócitos. Nós observamos, em todos os tempos de infecção analisados, cardiomioblastos GFP<sup>+</sup> co-marcadas com miosina indicando a participação da medula óssea na formação de cardiomiócitos. Similarmente, Fukuda; Fujita (2005), observaram cardiomiócitos derivados da medula óssea em camundongos quiméricos após infarto agudo do miocárdio. Alvarez-Dolado et al. (2003), utilizando camundongos quiméricos, demonstraram que células da medula óssea naturalmente se fundem com neurônios, cardiomiócitos e hepatócitos em condições normais, ou seja, sem lesão, enquanto a transdiferenciação não foi observada. Este fato sugere que o processo de transdiferenciação é mais frequente quando há lesão tecidual.

Existem evidências na literatura para a ocorrência de fusão e transdiferenciação entre diferentes populações de células da medula óssea (hematopoiéticas, mesenquimais e monócitos) e células parenquimatosas de diferentes tecidos como fígado, coração e músculo esquelético. Nós observamos mobilização para o sangue periférico de diferentes populações de células-tronco nos animais chagásicos (mesenquimais – CD45<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> e hematopoiéticas – CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>) e nos animais com esquistossomose (mesenquimais e progenitoras endoteliais – CD45<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>), sugerindo que o tipo de população recrutada pode variar de acordo com a lesão. Na medula óssea estão presentes também células progenitoras endoteliais, que constituem uma população heterogênea de células, de onde são liberadas para o sangue periférico (HAQUE; ALEXANDER; BRUCE, 2012) e deste, migram para onde há lesão no endotélio e neovascularização (SUN et al., 2012). Estas células contribuem para a homeostase vascular e reparo endotelial (HAQUE; ALEXANDER; BRUCE, 2012), e expressam uma variedade de marcadores, dependendo do estágio de maturação. Marcadores como CD31 (PECAM-1), VE-caderina e fator de von Willebrand são expressos por células mais maduras encontradas no sangue periférico (HRISTOV; ERL; WEBER, 2003). Estudos tem relatado que condições patológicas podem influenciar o número de células progenitoras endoteliais, levando ao seu aumento ou redução (revisito por HRISTOV et.al., 2003; SHIRAKURA et al., 2011). Em pacientes com doença hepática crônica, por exemplo, Kaur et al., (2012) observaram aumento de células progenitoras endoteliais (EPC) no sangue periférico quando comparados com pacientes saudáveis e uma correlação positiva entre o número de EPC e progressão da doença. Nós encontramos

aumento de progenitores endoteliais (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>) no sangue periférico das quimeras infectadas pelo *S. mansoni* e células derivadas da medula contribuindo para a formação de vasos no parênquima hepático destes animais. O *S. mansoni* vive dentro do sistema vascular do hospedeiro, onde as fêmeas depositam seus ovos. Estes são carregados pelo fluxo portal até alcançarem os pré-capilares hepáticos, nos quais ficam presos e provocam seu rompimento (BAPTISTA; ANDRADE, 2005). Este íntimo contato dos ovos com a parede vascular promove a proliferação de células endoteliais (LENZI; SOBRAL; LENZI, 1988), que é induzida pelos antígenos solúveis dos ovos (FREEDMAN; OTTESEN, 1988). Portanto, a angiogênese é um importante processo na esquistossomose e pode contribuir tanto para a fibrogênese como para a regressão da fibrose (ANDRADE; SANTANA, 2010).

Soares et.al. (2010) observaram um aumento significativo na expressão das quimiocinas MCP 1, 2 e 3 no coração de camundongos chagásicos crônicos. Tais quimiocinas contribuem para o recrutamento de monócitos e linfócitos, que são as principais células encontradas no infiltrado inflamatório em camundongos chagásicos. Paiva et al., (2009) demonstraram que na ausência de MCP-1 não ocorre formação de infiltrado mononuclear focal no coração de camundongos infectados pelo *T. cruzi* e há um aumento da carga parasitária. Nós observamos um aumento significativo de tais quimiocinas no coração e no músculo esquelético dos animais na fase aguda da infecção. Outra quimiocina cuja produção estava aumentada nos animais chagásicos foi SDF-1, importante no recrutamento de células-tronco através da ligação em seu receptor presente na superfície das células endoteliais e células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais (LAU; KANE, 2010).

A contribuição das células derivadas de medula óssea para a fibrose hepática ainda é discutida. Estudos prévios utilizando camundongos quiméricos com lesão aguda (BABA et.al, 2004) ou crônica (MIYATA et. al., 2008) induzida pelo CCl<sub>4</sub> demonstraram miofibroblastos derivados da medula óssea. Contrariamente, outros estudos utilizando o mesmo modelo (PAREDES et.at., 2012, HIGASHIYAMA et.al., 2007) não encontraram células derivadas da medula óssea positivas para  $\alpha$ SMA ou encontraram raras células (HIGASHIYAMA et.al., 2009). Similarmente em nosso estudo, raras células positivas para  $\alpha$ SMA foram observadas, o que sugere uma contribuição limitada da medula óssea para a formação de fibrose no modelo estudado.

Portanto, nossos dados reforçam o papel fundamental da medula óssea na doença de Chagas e na esquistossomose, seja fornecendo células inflamatórias, tais como macrófagos e linfócitos, que participam da formação das lesões características de cada doença, seja contribuindo para a regeneração através de células-tronco e progenitores que originam células dos músculos cardíaco e esquelético, hepatócitos e vasos sanguíneos.

## 7.0 CONCLUSÕES

1. Diferentes populações de células derivadas da medula óssea são mobilizadas para o sangue periférico durante a infecção experimental pelo *S. mansoni* bem como *T. cruzi* e são recrutadas para os órgãos lesionados como fígado, coração e músculo esquelético, onde participam do processo de reparo;
2. Células da medula óssea contribuem para a formação de diferentes tipos celulares como hepatócitos, miócitos, cardiomiócitos, células endoteliais e fibrócitos e também constituem as células do infiltrado inflamatório nestes modelos, participando desta forma tanto na patogênese como na regeneração das lesões;
3. Nossos achados sugerem um possível efeito benéfico da terapia com células de medula óssea na fase crônica da doença de Chagas e esquistossomose, por melhorar o processo de reparo que ocorre naturalmente.

## 8.0 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Cellular and molecular immunology. 6Ed; Philadelphia: Elsevier, 2007.
- ABEDI, M. et al. Critical variables in the conversion of marrow cells to skeletal muscle. Blood, v. 106, n. 4, Aug 15, p. 1488-1494, 2005.
- ABUMAREE, M. et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev, v. 8, n. 2, Jun, p. 375-392, 2012.
- ALISON, M. R. et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. Nature, v. 406, n. 6793, Jul 20, p. 257, 2000.
- ALVAREZ-DOLADO, M. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. Nature, v. 425, n. 6961, Oct 30, p. 968-973, 2003.
- ANDERSON, D. J.; GAGE, F. H.; WEISSMAN, I. L. Can stem cells cross lineage boundaries? Nat Med, v. 7, n. 4, Apr, p. 393-395, 2001.
- ANDRADE, Z. A.; SANTANA, T. S. Angiogenesis and schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 105, n. 4, Jul, p. 436-439, 2010.
- ANDRADE, Z. A. Patologia da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. 2 Ed; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- ANDRADE, Z. A. Mechanisms of myocardial damage in trypanosoma cruzi infection. Ciba Found Symp, v. 99, n., p. 214-233, 1983.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. Parasite Immunol, v. 31, n. 11, Nov, p. 656-663, 2009.
- ANDRADE, Z. A. et al. Myocardial changes in acute trypanosoma cruzi infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. Am J Pathol, v. 144, n. 6, Jun, p. 1403-1411, 1994.
- ANDRADE, Z. A. et al. Histopathology of the conducting tissue of the heart in chagas' myocarditis. Am Heart J, v. 95, n. 3, Mar, p. 316-324, 1978.



ANDRADE, Z. A.; CHEEVER, A. W. Characterization of the murine model of schistosomal hepatic periportal fibrosis ('pipestem' fibrosis). Int J Exp Pathol, v. 74, n. 2, Apr, p. 195-202, 1993.

ARNOLD, L. et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. J Exp Med, v. 204, n. 5, May 14, p. 1057-1069, 2007.

BAPTISTA, A. P.; ANDRADE, Z. A. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 100, n. 2, Apr, p. 183-185, 2005.

BOLL, M. et al. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. Z Naturforsch C, v. 56, n. 7-8, Jul-Aug, p. 649-659, 2001.

BYDŁOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. Rev Bras Hematol Hemoter, v 31 (Supl.1), n. 7, Jul, p. 25-35, 2009.

CAMARGO, F. D. et al. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. Nat Med, v. 9, n. 12, Dec, p. 1520-1527, 2003.

CARVALHO, A. B. et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. Stem Cells, v. 26, n. 5, May, p. 1307-1314, 2008.

CORBEL, S. Y. et al. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. Nat Med, v. 9, n. 12, Dec, p. 1528-1532, 2003.

DI VINICIUS, I.; BATISTA, A. P.; BARBOSA, A. A.; ANDRADE Z. A. Morphological signs of cirrhosis regression. Experimental observations on carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis of rats. Pathol Res Pract.;V. 201, n. 6, Aug, p. 449-56, 2005.

DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B.; DE CARVALHO, A. C. [bone marrow cells transplant in the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy]. Rev Soc Bras Med Trop, v. 37, n. 6, Nov-Dec, p. 490-495, 2004.

ELKHAFIF, N. et al. Homing of transplanted bone marrow cells in livers of schistosoma mansoni-infected mice. APMIS, v. 118, n. 4, Apr, p. 277-287, 2010.

- FAUSTO, N. Liver regeneration and repair: Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. Hepatology, v. 39, n. 6, Jun, p. 1477-1487, 2004.
- FERRARI, G. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science, v. 279, n. 5356, p. 1528-1530, 1998.
- FREEDMAN, D. O.; OTTESEN, E. A. Eggs of schistosoma mansoni stimulate endothelial cell proliferation in vitro. J Infect Dis, v. 158, n. 3, Sep, p. 556-562, 1988.
- FORBES, S. J. et al. Adult stem cell plasticity: New pathways of tissue regeneration become visible. Clin Sci (Lond), v. 103, n. 4, Oct, p. 355-369, 2002.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet, v. 3, n. 4, Oct, p. 393-403, 1970.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis -- overview. Toxicology, v. 254, n. 3, Dec 30, p. 120-129, 2008.
- FRIEDMAN, S. L. et al. Isolated hepatic lipocytes and kupffer cells from normal human liver: Morphological and functional characteristics in primary culture. Hepatology, v. 15, n. 2, Feb, p. 234-243, 1992.
- FUKUDA, K.; FUJITA, J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. Kidney Int, v. 68, n. 5, Nov, p. 1940-1943, 2005.
- GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin Liver Dis, v. 21, n. 3, Aug, p. 311-335, 2001.
- HAQUE, S.; ALEXANDER, M. Y.; BRUCE, I. N. Endothelial progenitor cells: A new player in lupus? Arthritis Res Ther, v. 14, n. 1, p. 203, 2012.
- HIGASHIYAMA, R. et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. Hepatology, v. 45, n. 1, Jan, p. 213-222, 2007.

HIGASHIYAMA, R. et al. Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. Gastroenterology, v. 137, n. 4, Oct, p. 1459-1466 e1451, 2009.

HRISTOV, M.; ERL, W.; WEBER, P. C. Endothelial progenitor cells: Mobilization, differentiation, and homing. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v. 23, n. 7, Jul 1, p. 1185-1189, 2003.

HINZ, B. et al. The myofibroblast: One function, multiple origins. Am J Pathol, v. 170, n. 6, Jun, p. 1807-1816, 2007.

HOTEZ, P. J. et al. Control of neglected tropical diseases. N Engl J Med, v. 357, n. 10, Sep 6, p. 1018-1027, 2007.

IREDALE, J. P. Models of liver fibrosis: Exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. J Clin Invest, v. 117, n. 3, Mar, p. 539-548, 2007.

IWAMOTO, T. et al. Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice. Cell Tissue Res, v. 351, n. 3, Mar, p. 487-495, 2013.

JANG, Y. Y. et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. Nat Cell Biol, v. 6, n. 6, Jun, p. 532-539, 2004.

JASMIN et al. Mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of chagas disease. Where do the cells go? PLoS Negl Trop Dis, v. 6, n. 12, p. e1971, 2012.

KAJSTURA, J. et al. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. Circ Res, v. 96, n. 1, Jan 7, p. 127-137, 2005.

KANJI, S.; POMPILI, V. J.; DAS, H. Plasticity and maintenance of hematopoietic stem cells during development. Recent Pat Biotechnol, v. 5, n. 1, Apr, p. 40-53, 2011.

KAUR, S. et al. Increased number and function of endothelial progenitor cells stimulate angiogenesis by resident liver sinusoidal endothelial cells (secs) in cirrhosis through paracrine factors. J Hepatol, v. 57, n. 6, Dec, p. 1193-1198, 2012.

KOBERLE, F. Chagas' disease and chagas' syndromes: The pathology of american trypanosomiasis. Adv Parasitol, v. 6, n., p. 63-116, 1968.

- KODAMA, H. et al. Cardiomyogenic potential of mesenchymal progenitors derived from human circulating cd14+ monocytes. Stem Cells Dev, v. 14, n. 6, Dec, p. 676-686, 2005.
- KOLLAR, K. et al. Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction. Int J Cell Biol, v. 2009, n., p. 904682, 2009.
- KONIARIS, L. G. et al. Liver regeneration. J Am Coll Surg, v. 197, n. 4, Oct, p. 634-659, 2003.
- KORBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? N Engl J Med, v. 349, n. 6, Aug 7, p. 570-582, 2003.
- KORBLING, M.; ESTROV, Z.; CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. Bone Marrow Transplant, v. 32 Suppl 1, n., Aug, p. S23-24, 2003.
- KORBLING, M. et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. N Engl J Med, v. 346, n. 10, Mar 7, p. 738-746, 2002.
- KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. Gene Therapy, v. 9, p. 754-758, 2002.
- KUWANA, M. et al. Human circulating cd14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. J Leukoc Biol, v. 74, n. 5, Nov, p. 833-845, 2003.
- LABARGE, M. A.; BLAU, H. M. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. Cell, v. 111, n. 4, Nov 15, p. 589-601, 2002.
- LAGASSE, E. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med, v. 6, n. 11, Nov, p. 1229-1234, 2000.
- LAROCCA, T. F. et al. Transplantation of adipose tissue mesenchymal stem cells in experimental chronic chagasic cardiopathy. Arq Bras Cardiol, v., n., Apr 9, p., 2013.
- LAU, B. W.; KANE, A. B. Sdf1/cxcl12 is involved in recruitment of stem-like progenitor cells to orthotopic murine malignant mesothelioma spheroids. Anticancer Res, v. 30, n. 6, Jun, p. 2153-2160, 2010.

- LAU, B. W.; KANE, A. B. Sdf1/cxcl12 is involved in recruitment of stem-like progenitor cells to orthotopic murine malignant mesothelioma spheroids. Anticancer Res, v. 30, n. 6, Jun, p. 2153-2160, 2010.
- LEMOINNE, S. et al. Origins and functions of liver myofibroblasts. Biochim Biophys Acta, v. 1832, n. 7, Jul, p. 948-954, 2013.
- LENZI, H. L.; SOBRAL, A. C.; LENZI, J. A. Participation of endothelial cells in murine schistosomiasis. Braz J Med Biol Res, v. 21, n. 5, p. 999-1003, 1988.
- MIMEAULT, M.; HAUKE, R.; BATRA, S. K. Stem cells: A revolution in therapeutics- recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. Clin Pharmacol Ther, v. 82, n. 3, Sep, p. 252-264, 2007.
- MIYATA, E. et al. Hematopoietic origin of hepatic stellate cells in the adult liver. Blood, v. 111, n. 4, Feb 15, p. 2427-2435, 2008.
- MULLER, P. et al. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. Circulation, v. 106, n. 1, Jul 2, p. 31-35, 2002.
- MURACA, M. et al. Liver repopulation with bone marrow derived cells improves the metabolic disorder in the gunn rat. Gut, v. 56, n. 12, Dec, p. 1725-1735, 2007.
- NERVI, B.; LINK, D. C.; DIPERSIO, J. F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. J Cell Biochem, v. 99, n. 3, Oct 15, p. 690-705, 2006.
- ORLIC, D. et al. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. Ann N Y Acad Sci, v. 938, n., Jun, p. 221-229; discussion 229-230, 2001.
- OLIVEIRA, S. A. et al. Therapy with bone marrow cells reduces liver alterations in mice chronically infected by schistosoma mansoni. World J Gastroenterol, v. 14, n. 38, Oct 14, p. 5842-5850, 2008.
- OLIVEIRA, S. A. et al. Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. Cytotherapy, v. 14, n. 3, Mar, p. 339-349, 2012.
- PAIVA, C. N. et al. Ccl2/mcp-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute trypanosoma cruzi infection. J Leukoc Biol, v. 86, n. 5, Nov, p. 1239-1246, 2009.

PAREDES, B. D. et al. Bone marrow progenitor cells do not contribute to liver fibrogenic cells. World J Hepatol, v. 4, n. 10, Oct 27, p. 274-283, 2012.

RABANI, V. et al. Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. Cell Biol Int, v. 34, n. 6, Jun, p. 601-605, 2010.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. Lancet, v. 375, n. 9723, Apr 17, p. 1388-1402, 2010.

RECKNAGEL, R. O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol Rev, v. 19, n. 2, Jun, p. 145-208, 1967.

REY, L. Parasitologia. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 168.

RIBEIRO DOS SANTOS, R. 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, May 22, p. 2454-2461, 2012.

RIPOLL, C. B.; BUNNELL, B. A. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from egfp transgenic and non-transgenic mice. BMC Cell Biol, v. 10, n., p. 3, 2009.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Patologia – Bases patológicas das doenças. Editores: Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. 8<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 79 89.

RUHNKE, M. et al. Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. Transplantation, v. 79, p. 1097-1103, 2005.

RUSSO, F. P. et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. Gastroenterology, v. 130, n. 6, May, p. 1807-1821, 2006.

SAKAIDA, I. et al. Transplantation of bone marrow cells reduces ccl4-induced liver fibrosis in mice. Hepatology, v. 40, n. 6, Dec, p. 1304-1311, 2004.

SCHNEE, J. M.; HSUEH, W. A. Angiotensin ii, adhesion, and cardiac fibrosis. Cardiovasc Res, v. 46, n. 2, May, p. 264-268, 2000.

SETA, N.; KUWANA, M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating cd14+ monocytes. Exp Hematol, v. 38, n. 7, Jul, p. 557-563, 2010.

SETA, N.; KUWANA, M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. Keio J Med, v. 56, n. 2, Jun, p. 41-47, 2007.

SHERWOOD, R. I. et al. Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. Stem Cells, v. 22, n. 7, p. 1292-1304, 2004.

SHIRAKURA, K. et al. Impaired function of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in murine liver fibrosis. Biosci Trends, v. 5, n. 2, p. 77-82, 2011.

SOARES, M. B.; DOS SANTOS, R. R. [bone marrow stem cell therapies for chagas' disease cardiopathy and chronic hepatopathies: From the animal model to the patient]. Cien Saude Colet, v. 13, n. 1, Jan-Feb, p. 17-19; discussion 21-12, 2008.

SOARES, M. B. et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. Am J Pathol, v. 164, n. 2, Feb, p. 441-447, 2004.

SOARES, M. B.; 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, v. 73, n. 4, Dec, p. 547-559, 2001.

SOARES, M. B.; SANTOS, R. R. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 94 Suppl 1, n., p. 257-262, 1999.

SOARES, M. B. et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. J Infect Dis, v. 202, n. 3, Aug 15, p. 416-426, 2010.

SUN, J. H. et al. In vitro labeling of endothelial progenitor cells isolated from peripheral blood with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Mol Med Rep, v. 6, n. 2, Aug, p. 282-286, 2012.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: Systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infect Dis, v. 6, n. 7, Jul, p. 411-425, 2006.

TANOWITZ, H. B. et al. Perspectives on trypanosoma cruzi-induced heart disease (chagas disease). Prog Cardiovasc Dis, v. 51, n. 6, May-Jun, p. 524-539, 2009.

- TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and trypanosoma cruzi infection. Trends Parasitol, v. 18, n. 6, Jun, p. 262-265, 2002.
- THEISE, N. D. et al. Liver from bone marrow in humans. Hepatology, v. 32, n. 1, Jul, p. 11-16, 2000.
- THEISE, N. D. et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. Hepatology, v. 31, n. 1, Jan, p. 235-240, 2000.
- VASSILOPOULOS, G.; WANG, P. R.; RUSSELL, D. W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. Nature, v. 422, n. 6934, Apr 24, p. 901-904, 2003.
- VIEYRA, D. S.; JACKSON, K. A.; GOODELL, M. A. Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells. Stem Cell Rev, v. 1, n. 1, p. 65-69, 2005.
- WAGERS, A. J. et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. Science, v. 297, n. 5590, Sep 27, p. 2256-2259, 2002.
- WANLESS, I. R.; NAKASHIMA, E.; SHERMAN, M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. Arch Pathol Lab Med, v. 124, n. 11, Nov, p. 1599-1607, 2000.
- WEISSMAN, I. L. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell, v. 100, n. 1, Jan, p. 157-168, 2000.
- WANG, X. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. Nature, v. 422, n. 6934, Apr 24, p. 897-901, 2003.
- WILLENBRING, H. et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. Nat Med, v. 10, n. 7, Jul, p. 744-748, 2004.
- XYNOS, A. et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells undergo myogenic differentiation following a pax-7 independent pathway. Stem Cells, v. 28, n. 5, May, p. 965-973, 2010.



## 9.0 ANEXOS

### 9.1 ANEXO I

OLIVEIRA, S. A. et al. Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. Cytotherapy, v. 14, n. 3, Mar, p. 339-349, 2012.

### 9.2 ANEXO II

LAROCCA, T. F. et.al. Transplante de células mesenquimais de tecido adiposo na cardiopatia chagásica crônica experimental. Arq. Bras. Cardiol., v. 100, n. 5, May, p. 460-468, 2013.

## Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis

SHEILLA ANDRADE DE OLIVEIRA<sup>1,2\*</sup>, BRUNO SOLANO DE FREITAS SOUZA<sup>2,3\*</sup>, ELTON PEREIRA SÁ BARRETO<sup>2</sup>, CARLA MARTINS KANETO<sup>3</sup>, HÉLIO ALMEIDA NETO<sup>2,3</sup>, CARINE MACHADO AZEVEDO<sup>2,3</sup>, ELISALVA TEIXEIRA GUIMARÃES<sup>2</sup>, LUIZ ANTONIO RODRIGUES DE FREITAS<sup>3,4</sup>, RICARDO RIBEIRO-DOS-SANTOS<sup>2,3</sup> & MILENA BOTELHO PEREIRA SOARES<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil, <sup>2</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil, <sup>3</sup>Hospital São Rafael, Salvador, Bahia, Brazil, and <sup>4</sup>Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

### Abstract

**Background aims.** Cirrhosis, end-stage liver disease, is caused by different mechanisms of injury, associated with persistent inflammation. Galectin-3 is an important regulator of fibrosis that links chronic inflammation to fibrogenesis. We investigated the role of bone marrow cell (BMC) transplantation in chronic inflammation and hepatic fibrosis. **Methods.** Liver cirrhosis was induced by administration of carbon tetrachloride and ethanol to wild-type C57BL/6 or bone marrow chimeric mice. Bone marrow chimeras were generated by lethal irradiation and transplantation with BMC obtained from green fluorescent protein (GFP<sup>+</sup>) donors. Wild-type cirrhotic mice were transplanted with BMC without irradiation. Livers from chimeras and cirrhotic transplanted mice were obtained for evaluation of inflammation, fibrosis and regulatory factors [galectin-3, matrix metalloproteinase (MMP)-9, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ ]. **Results.** The development of cirrhosis was associated with increased expression of galectin-3 by F4/80<sup>+</sup> cells and intense migration of BMC to the liver. Furthermore, when transplanted after the establishment of cirrhosis, BMC also migrated to the liver and localized within the fibrous septa. Two months after BMC therapy, cirrhotic mice had a significant reduction in liver fibrosis and expression of type I collagen. We did not find any difference in levels of TGF- $\beta$ , TIMP-1 and MMP-9 between saline and BMC groups. However, the numbers of inflammatory cells, phagocytes and galectin-3<sup>+</sup> cells were markedly lower in the livers of cirrhotic mice treated with BMC. **Conclusions.** Our results demonstrate an important role for BMC in the regulation of liver fibrosis and that transplantation of BMC can accelerate fibrosis regression through modulatory mechanisms.

**Key Words:** carbon tetrachloride, galectin-3, hepatic cirrhosis, mice, stem cells

### Introduction

Cirrhosis is the end stage of many chronic liver diseases and represents a therapeutic challenge world-wide (1–3). The development of cirrhosis is initiated after repeated insults that cause chronic liver tissue damage, consequently inducing fibrosis and nodular regeneration of liver cells. This process is frequently associated with an inflammatory response and the activation of hepatic stellate cells, known as the most important source of extracellular matrix (ECM) production, along with different subtypes of myofibroblasts, such as fibrogenic cells from the epithelial-to-mesenchymal transition, periportal fibrocytes, and bone marrow-derived fibrocytes that synthesize ECM proteins (4,5). Persistent noxious stimuli lead to chronic activation of

macrophages and synthesis of molecules that promote fibrogenesis, such as galectin-3, a lectin that regulates a wide variety of biologic phenomena, establishing a link between chronic inflammation and fibrogenesis (6).

It has been shown that galectin-3 activates and stimulates the proliferation of myofibroblasts as well as increases their synthesis of collagen (7). Furthermore, galectin-3 expression has been associated with the development of fibrosis in a variety of organs, such as the kidney, liver, gut and heart (8,9). As a result of the persistent stimulus to fibrogenesis, with increased galectin-3 expression, profound alterations in the liver architecture occur, modifying the relationship between stromal components, vessels and hepatocytes, ultimately characterizing liver cirrhosis (10).

\*These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Milena B. P. Soares, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA, CEP 40296-710. E-mail: milena@bahia.fiocruz.br

(Received 21 November 2010; accepted 31 March 2011)

Liver transplantation is the only effective treatment available for patients with cirrhosis presenting chronic hepatic failure (2,11), and it remains a high-risk procedure limited by the availability of donated organs. In this context, the development of new therapeutic strategies for liver failure is necessary. Stem cell therapy has emerged as a potential tool in the treatment of liver disease (12). In recent years, many experimental studies have been carried out to evaluate the therapeutic efficacy of stem cells in models of acute hepatic injuries (13–24). Although the results have been promising, further studies on models of chronic liver disease are necessary. There is also a need to understand the mechanisms by which stem cell therapy can be beneficial in treating liver disease (25).

Cell therapy can act through a variety of mechanisms, either directly or indirectly by secretion of molecules that can counteract fibrogenesis, such as soluble mediators and metalloproteinases (21,26). The present study evaluated the effects of bone marrow cells (BMC) transplanted in mice with cirrhosis induced by long-term administration of carbon tetrachloride and ethanol ( $\text{CCl}_4 + \text{EtOH}$ ). Our results demonstrate the therapeutic potential of BMC in a well-established cirrhosis model and reinforce the idea that galectin-3 may be a potential intervention target in the treatment of liver fibrosis.

## Methods

### *Ethics statement*

Prior to undertaking the studies described here, approval for all the experiments using mice was obtained from the Gonçalo Moniz Research Center (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ; Salvador, Bahia, Brazil) Ethics Committee and certified as 001/2007, protocol number 24.

### *Animals*

Three-week-old male C57BL/6 wild-type and female enhanced green fluorescent protein (eGFP)-transgenic mice were used as recipients and donors of BMC, respectively. All the animals, weighing between 20 and 23 g, were raised and maintained at the Gonçalo Moniz Research Center/FIOCRUZ, in rooms with a controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ) environment under continuous air renovation conditions. Animals were housed in a 12-h light/12-h dark cycle (6.00–18.00) with rodent diet and water *ad libitum*.

### *Generation of bone marrow chimeras*

C57BL/6 female mice were irradiated with 6 Gy for depletion of BMC (Figure 1A) in a  $^{137}\text{Cesium}$  source

irradiator (CisBio International, Gif Sur Yvette France). BMC were obtained from the femurs and tibiae of male eGFP transgenic mice and used to reconstitute irradiated mice. The mononuclear cells were purified by centrifugation in Ficoll gradient at 1000 g for 15 min (Histopaque 1119 and 1077; 1:1; Sigma, St Louis, MO, USA). After two washings in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) medium (Sigma), the cells were filtered and resuspended in saline. Each irradiated mouse received an injection of  $10^7$  cells. Two weeks later, representative animals were killed and BMC were harvested to confirm repopulation by donor cells using flow cytometry analysis.

### *Induction of hepatic injury and cirrhosis*

Experimental cirrhosis was induced in wild-type and chimeric mice by administration of 0.2 mL 20%  $\text{CCl}_4$  dissolved in a mineral oil solution (Merck, Darmstadt, Germany) and diluted in olive oil through gavage twice a week, combined with 5% (v/v) ethanol (EtOH) in the drinking water (Figure 1B). Control mice were maintained in the same housing conditions as the experimental groups. Groups of animals were killed for evaluation after periods of 24 days, 2–3 months and 5–6 months.

### *Morphologic and morphometric hepatic analyzes*

Mice under anesthesia were perfused through the heart with 50 mL phosphate-buffered saline (PBS) followed by 200 mL paraformaldehyde at  $4^\circ\text{C}$ . Liver slices were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Five micrometer-thick sections were stained with either hematoxylin-eosin (H&E) for histologic analysis and to quantify inflammation, or picrosirius red to quantify fibrosis. Analyzes were performed on whole liver sections after slide scanning using the Aperio ScanScope system (Aperio Technologies, Vista, CA, USA). The images were analyzed using the Image Pro program (version 7.0; Media Cybernetics, San Diego, CA, USA). A mean area of  $54\,636\,978\ \mu\text{m}^2/\text{mouse}$  was analyzed.

Cirrhosis was defined by the presence of hepatic cell nodules delimited by fibrosis occupying most of the liver parenchyma. The morphologic parameters analyzed were presence of steatosis, ballooning cells, apoptosis, necrosis, Mallory–Denk bodies, ductular proliferation and inflammation (portal and acinar). These parameters were classified according to intensity in five grades, ranging from 0 to 4.

### *Transplantation of BMC to wild-type C57BL/6 mice*

Six months after treatment with  $\text{CCl}_4 + \text{EtOH}$ , the administration of these drugs was suspended and the

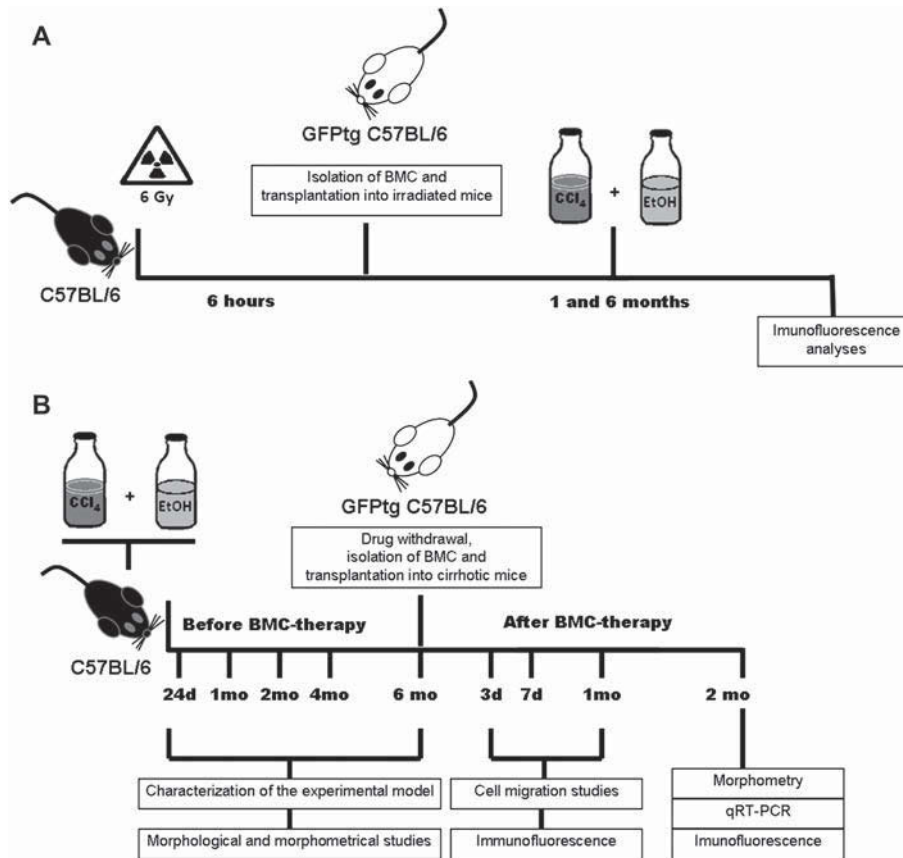


Figure 1. A schematic illustration of the experimental design. Generation of bone marrow chimeras and hepatic injury (A). C57BL/6 female mice were irradiated (6 Gy) and transplanted with BMC obtained from GFP<sup>+</sup> donors ( $10^7$  cells/mouse). Chimeric mice were submitted to a cirrhosis-induction protocol with administration of CCl<sub>4</sub> + EtOH, and were killed 1 month ( $n=5$ ) or 6 months ( $n=5$ ) later. Control chimeric mice remained without injury at the same time-points ( $n=10$ ). Induction of experimental liver cirrhosis and therapy with BMC (B). Groups of mice were treated with CCl<sub>4</sub> + EtOH. Normal controls were maintained in the same housing conditions. Mice were killed for morphologic evaluations and characterization of the experimental model ( $n=4$ /time-point) after different periods of CCl<sub>4</sub> + EtOH administration (24 days and 2, 3, 5 and 6 months). Cirrhotic mice (treated for 6 months with CCl<sub>4</sub> + EtOH) were transplanted with BMC or injected with saline and killed 2 months later for morphometric, immunofluorescence and qRT-PCR studies ( $n=5-8$  mice/group).

wild-type C57BL/6 mice were submitted to BMC transplantation (Figure 1B). BMC were obtained from femurs and tibiae of C57BL/6 eGFP transgenic mice. BMC were purified by centrifugation in a Ficoll gradient (Histopaque 1119 and 1077, 1:1; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 1000 *g* for 15 min. BMC were suspended in saline and injected into the cirrhotic wild-type C57BL/6 mice. The isolated BMC were analyzed using flow cytometry with the following conjugated antibodies from Becton Dickinson (San Diego, CA, USA): stem cell antigen-1 (Sca-1)-phycoerythrin (PE)/Cyanine (Cy)5, CD45-Allophycocyanin (APC), CD44-PE, CD34-PE, CD11b-PE and CD117-PE. Acquisition and analysis were performed in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). The following percentages were obtained:  $96.51 \pm 1.32$  for GFP<sup>+</sup> cells,  $0.11 \pm 0.032$  for Sca-1<sup>+</sup> cells,  $96.35 \pm 3.12$  for CD45<sup>+</sup> cells,  $92.72 \pm 3.23$  for CD44<sup>+</sup> cells,  $0.02 \pm 0.05$  for CD34<sup>+</sup> cells,  $60.22 \pm 5.71$  for CD11b<sup>+</sup> cells and  $0.17 \pm 0.04$  for CD117<sup>+</sup> cells.

One or three doses of  $3 \times 10^7$  cells/mouse were administered intravenously, via the retro-orbital plexus, with 7 days between injections. Control cirrhotic mice received saline injections at similar intervals. Mice were killed at various time-points after cell treatment.

#### Immunofluorescence analysis

The 5- $\mu$ m frozen sections obtained from the livers of mice were fixed in 4% cold paraformaldehyde in a 0.1 M phosphate buffer. The presence of transplanted GFP<sup>+</sup> BMC in the liver tissue was analyzed using direct fluorescence microscopy. The following antibodies were used: anti-cytokeratin-18, diluted 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA); anti-CD45, diluted 1:100 (Caltag, Buckingham, UK); anti-albumin, diluted 1:400 (DAKO, Glostrup, Denmark); and anti-galectin-3, diluted 1:50 (Santa Cruz Biotechnology). Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (VectaShield hard set mounting



medium with DAPI H-1500; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The presence of fluorescent cells was observed using an AX70 microscope with an epifluorescence system plus grid to enhance the fluorescence resolution (Optigrid, structured light imaging system; Thales Optem Inc., Olympus, Center Valley, PA, USA), using appropriate filters (Olympus) in a FluoView1000 confocal microscope (Olympus, Optigrid, Fairport, NY, USA). Quantification of galectin-3<sup>+</sup> cells, autofluorescent cells and type I collagen were performed in 10 random fields per section. Cell images were captured using 400 $\times$  magnification and analyzed using Image Pro Plus software.

#### Real-time-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from the livers using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the concentration was determined by photometric measurement. A high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to synthesize cDNA from 1  $\mu$ g RNA, in accordance with manufacturer's recommendations. Real-time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) assays were performed to detect the expression levels of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and matrix metalloproteinase (MMP)-9 genes. qRT-PCR amplification mixtures contained 20 ng template cDNA, and Taqman master mix (10  $\mu$ L) (Applied Biosystems) probes for TGF- $\beta$  (Mm00441724\_m1), TIMP-1 (Mm00441818\_m1) and MMP-9 (Mm00442991\_m1) in a final volume of 20  $\mu$ L. All reactions were run in duplicate on an ABI7500 sequence detection system (Applied Biosystems) under standard thermal cycling conditions. The mean cycle threshold (*Ct*) values from duplicate measurements were used to calculate expression of the target gene, with normalization to an internal control glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) using the  $2^{-DCt}$  formula. Experiments with coefficients of variation greater than 5% were excluded. A no-template control (NTC) and no-reverse transcription controls (No-RT) were also included.

#### Statistical analysis

Data were analyzed using a Student's *t*-test or ANOVA, followed by Newman-Keuls (TGF- $\beta$  and morphology) or Tukey (qRT-PCR) tests, using Prism Software (version 5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant if *P* was equal to or less than 0.05.

## Results

### Cirrhosis induction in mice chronically treated with CCl<sub>4</sub> + EtOH

Chronic administration of CCl<sub>4</sub> + EtOH caused progressive morphologic alterations in the liver. After 6 months of repeated administration of CCl<sub>4</sub> + EtOH, the livers exhibited morphologic alterations, such as a nodular surface and brownish coloring (Figure 2A, B). The normal parenchyma was replaced by regenerative nodules (Figure 2C, D) measuring  $453 \pm 199$   $\mu$ m in diameter (ranging from 196 to 770  $\mu$ m) delimited by fibrous septa. Vascular alterations, including portal vein dilation, were observed (Figure 2A). The survival

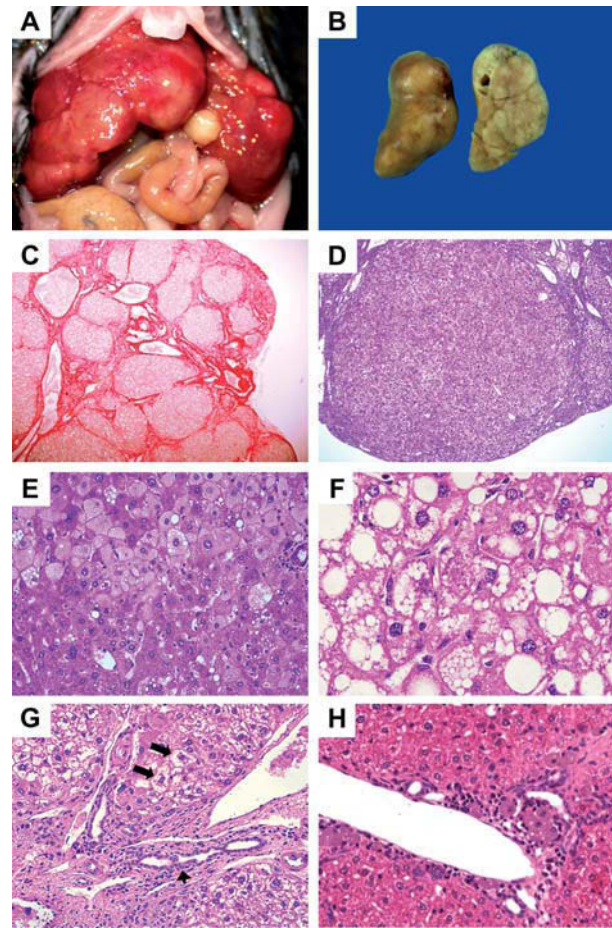


Figure 2. Macroscopic and morphologic aspects of cirrhosis in mice submitted to CCl<sub>4</sub> + EtOH administration for 6 months. Prominent areas of nodules on the liver surface of cirrhotic mice (A,B). Hepatic nodules of variable size subdivided into irregular fibrous septa could be seen in the picrosirius red-stained section by optical microscopy (c) (40 $\times$ ). Regenerative macronodule (D) (H&E, 100 $\times$ ). Ballooning cells (E) (H&E, 200 $\times$ ) and the presence of micro- and macrovacuolar steatosis (F) (H&E, 400 $\times$ ). Proliferation of ductular cells (G) and the presence of Mallory bodies (G, arrows) (H&E, 200 $\times$ ). After 6 months of CCl<sub>4</sub> + EtOH treatment, the foci of periportal chronic inflammation associated with large phagocytic cells (D, arrows) were seen with H&E staining (H) (200 $\times$ ).

during 6 months of  $\text{CCl}_4 + \text{EtOH}$  administration was about 70% (37/53).

Short-term administration (24 days) of  $\text{CCl}_4 + \text{EtOH}$  induced hepatic cell necrosis and a mixed inflammatory infiltrate with a predominance of mononuclear cells, especially in centrilobular areas (data not shown). At this time-point, mild hepatocellular ballooning without steatosis was observed. Some incomplete fibrous septa linking vascular structures were also observed. After a longer period of  $\text{CCl}_4 + \text{EtOH}$  administration (2–5 months), the normal liver architecture was partially replaced by nodules of regenerating liver cells surrounded by fibrous septa. At this time-point, a mild ductular proliferation was present within portal tracts, as well as in fibrous septa (data not shown).

Cirrhosis was established after 6 months of continuous  $\text{CCl}_4 + \text{EtOH}$  administration, and characterized by a diffuse liver alteration with fibrous tissue completely surrounding nodules of regenerative hepatocytes, resulting in profound alteration of the liver architecture (Figure 2C, D). Some cirrhotic nodules showed microvacuolar hepatocellular steatosis and foci ballooning cells (Figure 2E, F), and hyaline Mallory–Denk bodies were frequently observed

(Figure 2G). Ductular cell proliferation was observed in connective tissue (Figure 2G).

Foci of inflammatory cells were seen within the fibrous septa (Figure 2H). Immunostaining for  $\text{F4/80}^+$ , a macrophage cell marker, demonstrated that many of the inflammatory cells were macrophages (Figure 3A). Among these cells, some showed an abundant clear brown cytoplasm. These cells had autofluorescent granules, were positive for the  $\text{F4/80}^+$  marker and also for galectin-3 (Figure 3B, C). These cells were observed in greater quantities at later time-points (Figure 3D–F), although some  $\text{F4/80}^+$  cells remained negative for galectin-3 (Figure 3C, detail).

#### Migration of BMC to injured liver

In order to evaluate the recruitment of BMC during the development of cirrhosis, bone marrow chimeras were generated and submitted to treatment with  $\text{CCl}_4 + \text{EtOH}$  or remained as uninjured controls. Acute and chronic hepatic injury induced by  $\text{CCl}_4 + \text{EtOH}$  resulted in an increase in the recruitment of BMC to the liver, compared with control animals.  $\text{GFP}^+$  cell numbers were found to be 2-fold increased in acutely

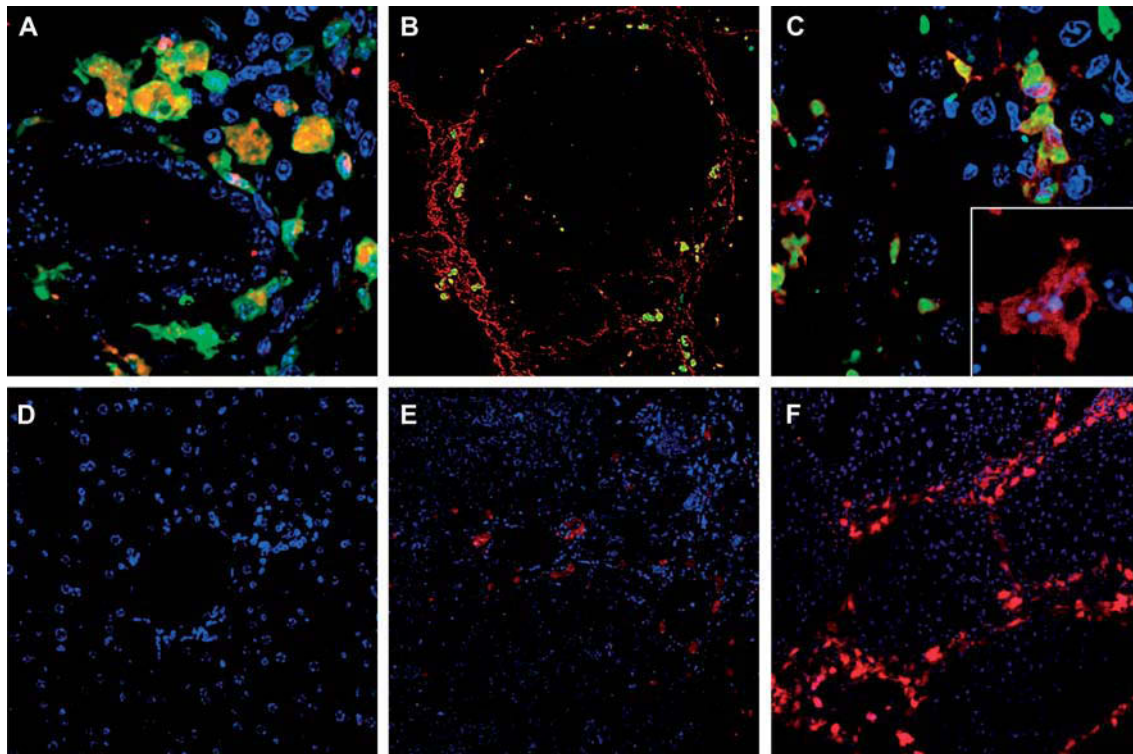


Figure 3. Presence of galectin-3<sup>+</sup> cells during the establishment of experimental cirrhosis. Phagocytic cells found in inflammatory infiltrates had deposits of autofluorescent material (red) and were also positive for F4/80 (green) (A) (1200 $\times$ ). Picosirius staining visualized by fluorescence microscopy showed the presence of autofluorescent cells (yellow) associated with fibrous septa (red) (B) (100 $\times$ ). Most galectin-3<sup>+</sup> (red) cells co-stained with F4/80 (green; C) (1200 $\times$ ) and a few galectin-3<sup>+</sup> cells were F4-80<sup>-</sup> (C, detail). Immunofluorescence staining with anti-galectin-3 (red) and DAPI (blue) in liver sections of non-injured mice (D) (400 $\times$ ) and  $\text{CCl}_4 + \text{EtOH}$ -treated mice for 2 months (E) (200 $\times$ ) and 6 months (F) (200 $\times$ ), which showed increased numbers of galectin-3<sup>+</sup> cells with time and their typical localization in areas of fibrous septa (F) (200 $\times$ ).



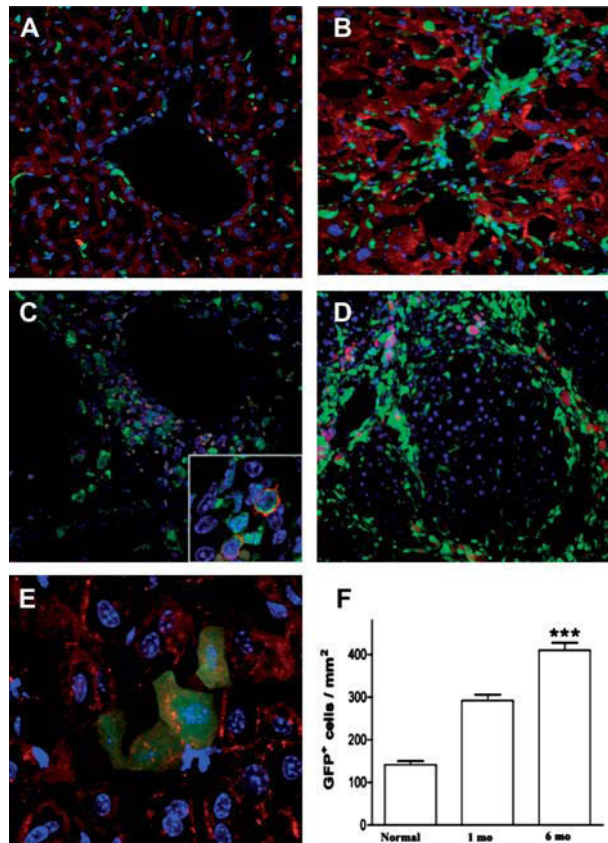


Figure 4. BMC migrate to the injured liver in chimeric mice. Immunofluorescence for detection of GFP (green), albumin (red) and nuclear counterstaining with DAPI (blue). Bone marrow GFP<sup>+</sup> positive cells were found in small numbers in sinusoids of non-injured chimeras (A) (400 $\times$ ) and at greater numbers in perivascular regions of acutely injured chimeras after 30 days of CCl<sub>4</sub> + EtOH treatment (B) (400 $\times$ ). Most infiltrating GFP<sup>+</sup> cells (green) were found in periportal inflammatory infiltrates at 30 days of CCl<sub>4</sub> + EtOH treatment and co-stained with CD45 (red) (C, detail) (200 $\times$ ). At 6 months of CCl<sub>4</sub> + EtOH treatment, GFP<sup>+</sup> cells (green) were mostly found in fibrous septa and some presented autofluorescent cytoplasmic deposits (red) (D) (200 $\times$ ). Rarely, hepatocytes co-stained with albumin (red) and GFP (green) were visualized after 6 months of CCl<sub>4</sub> + EtOH treatment (E) (800 $\times$ ). The GFP<sup>+</sup> cells were quantified in non-injured, 30-day injured and 6-months injured chimeras (F). Data are represented as the means  $\pm$  SEM of five animals per group. \* $P$  < 0.05 (F).

injured livers compared with uninjured controls (Figure 4B, F), and the number was three times greater in chronically injured mice (Figure 4C–F). In the non-injured control group, GFP<sup>+</sup> cells were found predominantly in sinusoids (Figure 4A).

However, in acutely injured livers GFP<sup>+</sup> cells were seen around the central vein in the hepatic lobules (Figure 4C), whereas in chronically injured livers they were found mainly within the fibrous septa (Figure 4D). Few cells co-expressing GFP and albumin could be found in the hepatic parenchyma in chronically injured mice (Figure 4E), with none found in uninjured controls. The number of GFP<sup>+</sup> cells in the parenchyma of chimeric

mice significantly increased at later time-points (Figure 4F).

In order to investigate whether BMC migrate to the livers of non-irradiated mice with established cirrhosis, the animals were transplanted intravenously with  $3 \times 10^7$  bone marrow mononuclear cells obtained from GFP transgenic mice. GFP<sup>+</sup> BMC were found in the liver sections of cirrhotic mice 3 days after transplantation (Figure 5A). At this time-point, GFP<sup>+</sup> cells were mostly small and round in shape and were found in portal area tracts. One week after transplantation, GFP<sup>+</sup> cells, mostly with an elongated shape, were found within the fibrous septa (Figure 5B). GFP<sup>+</sup> cells were not seen in the liver sections of mice analyzed 1 and 2 months after transplantation (data not shown).

#### *Effects of BMC transplantation in livers of cirrhotic mice*

To evaluate the effects of the transplanted cells into non-irradiated cirrhotic mice, liver sections were analyzed 2 months after the therapy with BMC. Mice were submitted to a 3-week protocol, with 1-weekly intravenous injections of  $3 \times 10^7$  cells. A reduction in fibrosis was observed in the BMC-treated mice, compared with controls (Figure 5C, D), which was confirmed by morphometric evaluation (Figure 6A). A marked reduction in collagen I was observed in the fibrous septa of livers from BMC-treated mice, compared with controls (Figure 6B). In addition, the number of inflammatory and large autofluorescent cells significantly decreased after BMC therapy (Figure 6C, D). In contrast with these results, transplantation of BMC to mice that were still receiving CCl<sub>4</sub> + EtOH between 4 and 6 months of the protocol did not lead to lower levels of fibrosis, compared with mice injected with saline (data not shown).

To investigate the mechanisms by which BMC therapy resulted in a reduction of fibrosis, we tested whether BMC transplantation modulated the production of the fibrogenic cytokine TGF- $\beta$ . Liver TGF- $\beta$  mRNA levels in cirrhotic mice were increased compared with normal controls. However, no differences were observed in the group treated with BMC compared with saline-treated cirrhotic mice, as investigated by qRT-PCR analysis (Figure 6E). Two additional factors associated with fibrosis, TIMP-1 and MMP-9, were also evaluated at the gene expression level. The same pattern of expression as found at the TGF- $\beta$  mRNA level was also observed with TIMP-1, a pro-fibrogenic factor. The expression of MMP-9, an anti-fibrogenic factor, was

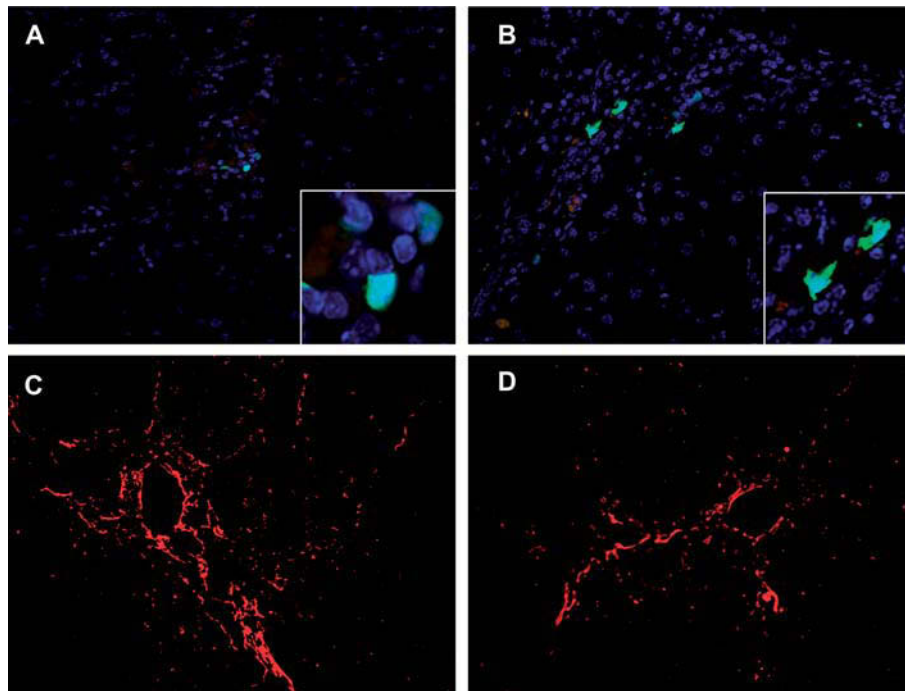


Figure 5. BMC migrate to cirrhotic liver and promote fibrosis reduction. Mice were transplanted intravenously with BMC after the establishment of cirrhosis and were killed 1 or 7 days later for fluorescence microscopy analysis. For visualization of GFP<sup>+</sup> cells (green), sections were mounted with nuclear counterstaining with DAPI (blue). Small, round-shaped GFP<sup>+</sup> cells were seen 1 day after the transplantation (A and detail), while GFP<sup>+</sup> with elongated shapes were seen in fibrous septa after 7 days (B and detail). Picosirius red staining for detection of collagen in liver sections of saline-treated © and BMC-treated (D) mice.

found to be similar among all groups analyzed (data not shown).

#### *Reduction of galectin-3 expression after BMC treatment in livers of cirrhotic mice*

The expression of galectin-3 in the livers of cirrhotic mice was evaluated. Galectin-3<sup>+</sup> cells were observed mainly in portal tracts and in fibrous septa in cirrhotic mice treated with saline (Figure 7A), whereas in the livers of BMC-treated cirrhotic mice galectin-3<sup>+</sup> cells were observed only in portal tracts (Figure 7B). Morphometric analysis revealed a marked decrease in the number of galectin-3<sup>+</sup> cells in the livers of mice 2 months after BMC transplantation, compared with saline-treated cirrhotic controls ( $P < 0.0001$ ; Figure 7C).

## Discussion

A growing number of reports have shown that BMC transplantation mitigates liver damage in acute experimental models (13–16,18–20,22). In the present study we report the beneficial effects of BMC transplantation in an experimental model of cirrhosis, induced by chronic administration of CCl<sub>4</sub> + EtOH. C57BL/6 mice chronically receiving CCl<sub>4</sub> + EtOH developed morphologic alterations that characterize

liver cirrhosis, providing a useful tool for studying mechanisms of fibrogenesis and fibrosis regression, as well as for the development of novel potential therapies.

The bone marrow mononuclear cell fraction tested in our study comprises a number of cell types and therefore additional studies are needed to identify which cell populations are responsible for the beneficial effects observed. However, despite being a heterogeneous population, transplantation of BMC is already a well-established procedure in medical practice, which helps translation of the results to clinical studies. In this regard, initial clinical studies using autologous BMC transplantation in patients with chronic liver disease have been conducted by our group and others (25,27).

Different populations of bone marrow-derived cells have been implicated in both the development as well as the regression of cirrhosis (21,28). The establishment of chronic liver injury and its progression to cirrhosis involves the activation of hepatic stellate cells, which are converted into fibroblasts and myofibroblasts and become the main source of ECM in liver fibrosis. Furthermore, the potential role of other fibroblast subpopulations has been described, such as fibrogenic cells from the epithelial-to-mesenchymal transition, periportal fibrocytes and bone marrow-derived cells (5). The role of BMC as another source



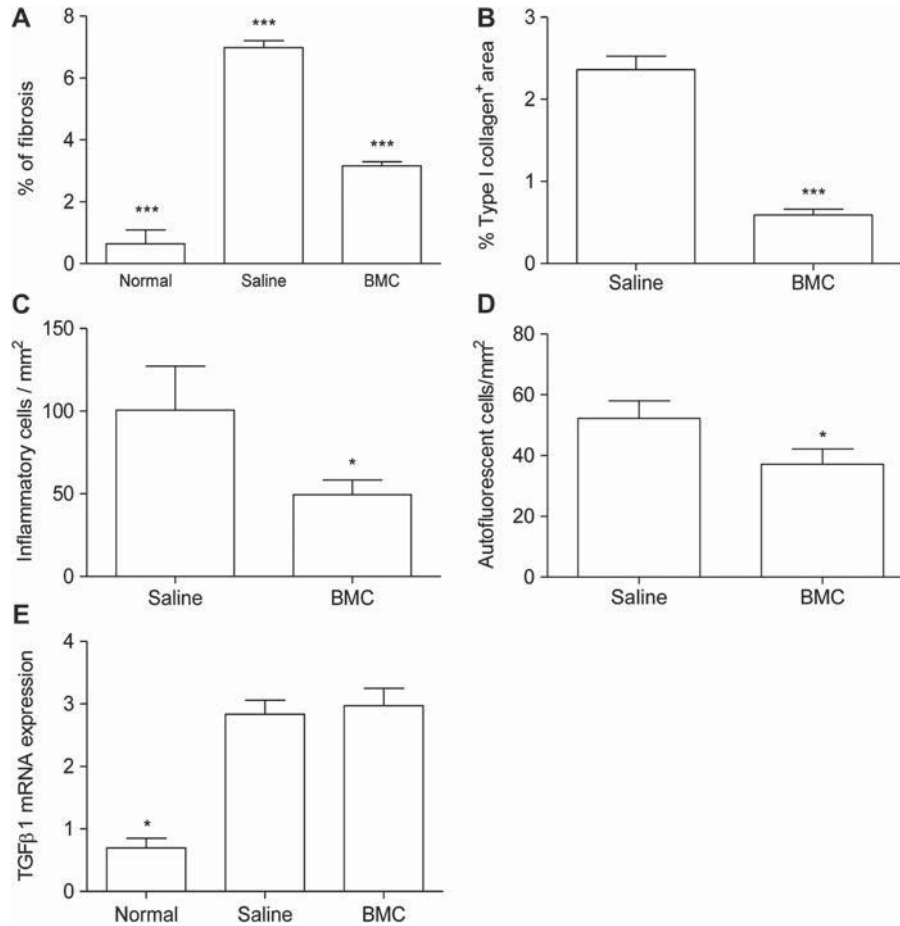


Figure 6. Effects observed after 2 months of BMC therapy on liver cirrhosis. Morphometric quantification of the percentage area of liver fibrosis assessed by picosirius red staining (A) and immunostaining with anti-type I collagen (B), demonstrating fibrosis reduction in the BMC-treated group compared with the saline-treated group. Quantification of inflammatory cells (C) and autofluorescent cells (D) in liver sections showing reduced numbers in the BMC-treated group compared with the saline-treated group. TGF- $\beta$  levels assessed in liver homogenates by qRT-PCR (E). Data are represented graphically as the mean  $\pm$  SEM of five to eight mice/group. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.0001$ .

of liver fibrocytes during fibrogenesis has been studied before by Higashiyama *et al.* (9), who reported that these cells were not important for the development of liver fibrosis. Kupffer cells and infiltrating bone marrow-derived macrophages are a crucial link between chronic inflammation and liver fibrosis (29). However, diverse populations of macrophages are involved in promoting anti-inflammatory effects, as well fibrolysis (29). Macrophage depletion has been shown to compromise fibrolysis during the regression of liver fibrosis (30).

Using bone marrow chimeric mice, the present study has demonstrated the migration of bone marrow-derived cells to the liver, particularly to the fibrous septa, during the development of cirrhosis. A small number of BMC participated in the generation of hepatocytes in chimeric mice submitted to a cirrhosis-inducing protocol. A few GFP<sup>+</sup> hepatocytes were also found in chimeric mice and in BMC-transplanted mice chronically infected with

*Schistosoma mansoni* (31). Previous reports have indicated that the finding of bone marrow-derived hepatocytes may be the result of fusion of BMC with hepatocytes (32). As we did not observe the presence of bone marrow-derived hepatocytes 2 months after cell transplantation, the contribution of these cells to hepatocyte renewal was not found to be relevant to the repair process.

BMC were found mainly in the fibrous septa of BMC-transplanted cirrhotic mice, and promoted regression of fibrosis, suggesting the potential anti-fibrogenic role of BMC by accelerating the process of fibrosis regression that was observed naturally 2 months after the withdrawal of CCl<sub>4</sub> + EtOH. This result was only achieved in the groups of mice treated with repeated injections of BMC over a 3-week period, and after the withdrawal of CCl<sub>4</sub> + EtOH. We were unable to detect any improvement in liver fibrosis when mice were treated with BMC during the cirrhosis induction protocol. In another study,

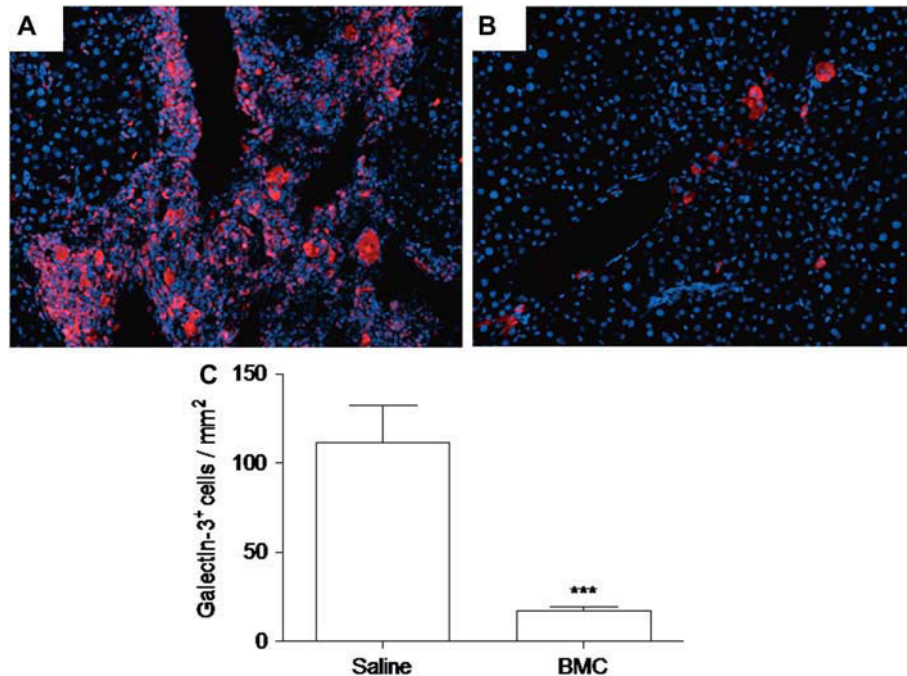


Figure 7. Reduced numbers of galectin-3<sup>+</sup> cells in livers of BMC-treated mice 2 months after therapy. Immunofluorescence for galectin-3 detection (red) in 5-mm frozen liver slices of saline-treated (A) (400 $\times$ ) and BMC-treated (B) (400 $\times$ ) mice, counterstained with DAPI (blue) for nuclei visualization. Quantification of galectin-3<sup>+</sup> cells in saline-treated and BMC-treated groups (C). Data represent the means  $\pm$  SEM of five to eight animals/group. \*\*\* $P < 0.0001$ .

increased fibrosis was found when unfractionated BMC were transplanted into mice that were still being injured by CCl<sub>4</sub> (33).

The reduction of fibrosis after BMC transplantation may be because of the modulatory effects exerted by the transplanted cells on non-parenchymatous liver cells. We observed a reduction in the total number of inflammatory cells, including phagocytes. Moreover, in our chronic experimental model, there was a strong relationship between the amount of fibrous tissue and the numbers of galectin-3<sup>+</sup> cells, which were mostly F4/80<sup>+</sup> macrophages. Macrophages have been shown to be key modulator cells in fibrogenesis, because they produce a number of mediators, including galectin-3 (29). There is evidence that galectin-3 induces a variety of intracellular signaling pathways that lead to the proliferation of hepatic stellate cells (8). This factor is an important activator of fibroblasts (6–8) and plays a pro-fibrotic role by regulating myofibroblast activation during fibrogenesis (7).

TGF- $\beta$ 1, a cytokine that promotes fibrosis in many organs, is mainly produced by hepatic stellate cells and stimulates the production of ECM components (34). The present study did not find any significant differences in TGF- $\beta$ 1 mRNA levels between saline- and BMC-treated groups. Similar results were obtained with protein assessment by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) in liver fragments (data not shown). This could be

explained by the fact that TGF- $\beta$ 1, as well as being a known pro-fibrogenic cytokine because of its effect on myofibroblast proliferation and collagen production, it is also a very important anti-inflammatory cytokine (35). In fact, this duality may explain the failure of TGF- $\beta$ 1-signaling inhibitors in the treatment of other fibrotic diseases (35). It is possible that a modulation of pro-fibrotic macrophage subsets, rather than a direct modulation of the production of TGF- $\beta$ 1, could explain our results. Studies using galectin-3-null mice treated with CCl<sub>4</sub> showed that galectin-3 may be required for TGF- $\beta$ -mediated myofibroblast activation and ECM production (7). Thus the marked reduction in galectin-3 expression after BMC transplantation suggests that the TGF- $\beta$ -mediated pathway and, consequently, ECM deposition might be affected by transplanted BMC.

Previous reports have shown the expression of MMP, which are associated with a reduction of liver fibrosis after cell transplantation, by bone marrow-derived cells (19,36). It has also been reported previously that liver macrophages can recruit neutrophils during the recovery phase. These cells also express MMP, which promote fibrolysis (37). Although the present study did not find alterations in MMP-9 and TIMP-1 gene expression levels among saline- and BMC-treated cirrhotic mice, it is possible that other MMP, such as MMP-13, may be involved in the

process of fibrosis regression after cell transplantation (36,38).

In conclusion, the present study has established a mouse model of cirrhosis with morphologic characteristics similar to those found in human cirrhosis, and shown that transplanted BMC migrate to the liver, where they modulate inflammation and fibrosis. The findings of a reduction in fibrous tissue and low galectin-3 expression in animals submitted to cell transplantation reiterate the role this molecule plays in the development of fibrosis, and calls attention to its importance as a target for anti-fibrotic therapies. Additional studies attempting to understand BMC cell populations better and the mechanisms by which BMC transplantation ameliorates hepatic diseases should be conducted to develop successful clinical therapies for liver fibrosis.

**Conflict of interest statement:** The authors claim they have no conflict of interest in this study.

## References

- Corrao G, Arico S. Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis. *Hepatology*. 1998;27:914–19.
- Keeffe EB. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology*. 2001;120:749–62.
- Tsui JJ, Pletcher MJ, Vittinghoff E, Seal K, Gonzales R. Hepatitis C and hospital outcomes in patients admitted with alcohol-related problems. *J Hepatol*. 2006;44:262–6.
- Dranoff JA, Wells RG. Portal fibroblasts: underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology*. 2010;51:1438–44.
- Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25:207–17.
- Sasaki S, Bao Q, Hughes RC. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies. *J Pathol*. 1999;187:481–9.
- Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:5060–5.
- Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, et al. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem*. 2003;278:18938–44.
- Higashiyama R, Moro T, Nakao S, Mikami K, et al. Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology*. 2009;137:1459–66.
- Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115:209–18.
- Neuberger J. Liver transplantation. *J Hepatol*. 2000;32:198–207.
- Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics – recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82:252–64.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000;6:1229–34.
- Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, et al. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl<sub>4</sub>-injured rats. *J Hepatol*. 2006;44:742–8.
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. 2003;422:901–4.
- Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol*. 2004;6:532–9.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98:1076–84.
- Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, et al. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation*. 2004;78:83–8.
- Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2004;40:1304–11.
- Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol*. 2005;11:3431–40.
- Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2007;45:213–22.
- Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol*. 2005;33:108–19.
- Di Campli C, Piscaglia AC, Pierelli L, Rutella S, Bonanno G, et al. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis*. 2004;36:603–13.
- Tang XP, Yang X, Tan H, Ding YL, Zhang M, et al. Clinical and experimental study on the therapeutic effect of umbilical cord blood transplantation on severe viral hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2003;9:1999–2003.
- Souza BS, Nogueira RC, De Oliveira SA, De Freitas LA, Lyra LG, et al. Current status of stem cell therapy for liver diseases. *Cell Transplant*. 2009;18:1261–79.
- Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1572:285–93.
- Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Braga EL, et al. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22:33–42.
- Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2006;45:429–38.
- Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2010;30:245–57.
- Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest*. 2005;115:56–65.
- Oliveira SA, Souza BS, Guimaraes-Ferreira CA, Barreto ES, Souza SC, et al. Therapy with bone marrow cells reduces liver alterations in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni*. *World J Gastroenterol*. 2008;14:5842–50.
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003;422:897–901.
- Thomas JA, Pope C, Wojtacha D, Robson AJ, Gordon-Walker TT, et al. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits

- host effector cells improving fibrosis, regeneration and function. *Hepatology*. 2011;53:2003–15.
34. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci*. 2002;7:793–807.
  35. Fattouh R, Jordana M. TGF-beta, eosinophils and IL-13 in allergic airway remodeling: a critical appraisal with therapeutic considerations. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008; 7:224–36.
  36. Rabani V, Shahsavani M, Gharavi M, Piryaei A, Azhdari Z, et al. Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. *Cell Biol Int*. 2010;34: 601–5.
  37. Harty MW, Papa EF, Huddleston HM, Young E, Nazareth S, et al. Hepatic macrophages promote the neutrophil-dependent resolution of fibrosis in repairing cholestatic rat livers. *Surgery*. 2008;143:667–78.
  38. Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol*. 2007; 178:5288–95.

## Transplante de Células Mesenquimais de Tecido Adiposo na Cardiopatia Chagásica Crônica Experimental

*Transplantation of Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells in Experimental Chronic Chagasic Cardiomyopathy*

Ticiania Ferreira Larocca<sup>1,2</sup>, Bruno Solano de Freitas Souza<sup>1,2</sup>, Cristina Aragão Silva<sup>1,2</sup>, Carla Martins Kaneto<sup>2</sup>, Adriano Costa de Alcantara<sup>2</sup>, Carine Machado Azevedo<sup>2</sup>, Murilo Fagundes Castro<sup>1,2</sup>, Simone Garcia Macambira<sup>1</sup>, Milena Botelho Pereira Soares<sup>1,2</sup>, Ricardo Ribeiro-dos-Santos<sup>1,2</sup>

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz<sup>1</sup>; Hospital São Rafael<sup>2</sup>, Salvador, BA – Brasil

### Resumo

**Fundamento:** A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma das mais importantes causas de insuficiência cardíaca na América Latina. A terapia celular vem sendo investigada como uma possível opção terapêutica para pacientes com doenças cardiovasculares.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica.

**Métodos:** Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* e, após seis meses de infecção, foram tratados com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (CTTA) ou com meio DMEM (controle). O grupo tratado recebeu duas injeções intraperitoneais de CTTA (1x10<sup>6</sup> células / dose), com um mês de intervalo entre as duas doses. Antes e após 1 e 2 meses de tratamento, os animais chagásicos e controles normais foram submetidos à eletrocardiograma e teste ergoespirométrico. Todos os animais foram sacrificados sob anestesia após 2 meses de tratamento, para análise histopatológica do coração.

**Resultados:** Não foi observada melhora de arritmias e da função cardiovascular no grupo tratado com CTTA, porém secções de corações de camundongos deste grupo apresentaram uma redução significativa do número de células inflamatórias ( $p < 0,0001$ ) e da área de fibrose ( $p < 0,01$ ) em comparação com animais chagásicos tratados com DMEM.

**Conclusão:** Deste modo, conclui-se que a administração de CTTA por via intraperitoneal é capaz de reduzir inflamação e fibrose no coração de camundongos cronicamente infectados por *T. cruzi*, porém não teve efeitos na função cardíaca dois meses após o transplante. (Arq Bras Cardiol. 2013; 100(5):460-468)

**Palavras-chave:** Cardiomiopatia Chagásica / terapia, Células-Tronco, Terapia Celular, Tecido Adiposo.

### Abstract

**Background:** Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a major cause of heart failure in Latin America. Tissue therapy has been investigated as a possible therapeutic option for patients with cardiovascular disease.

**Objective:** This study evaluated the effects of therapy with mesenchymal stem cells in an experimental model of chronic Chagasic cardiomyopathy.

**Methods:** C57BL/6 mice were infected with 1000 trypomastigotes from the Colombian strain of *T. cruzi* and, after six months of infection, were treated with mesenchymal human stem cells from adipose tissue (ADSC) or with Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium – DMEM (control). The treated group received two intraperitoneal injections of ADSC (1x10<sup>6</sup> cells/dose), with a month interval between the two doses. Before and after the first and second months of treatment, the chagasic and normal control animals underwent cardiopulmonary exercise testing and electrocardiography. All animals were sacrificed under anesthesia after two months of treatment for histopathological analysis of the heart.

**Results:** No improvement was observed in arrhythmias and cardiovascular function in the group of animals treated with ADSC; however, sections of mice hearts in this group revealed a significant reduction in the number of inflammatory cells ( $p < 0.0001$ ) and areas of fibrosis ( $p < 0.01$ ) in comparison with chagasic animals treated with DMEM.

**Conclusion:** Thus, it is concluded that administration of intraperitoneal ADSC can reduce inflammation and fibrosis in the heart of mice chronically infected with *T. cruzi*; however, there were no effects on the cardiac function two months after transplantation. (Arq Bras Cardiol. 2013; 100(5):460-468)

**Keywords:** Chagas Cardiomyopathy / therapy; Stem Cells; Tissue Therapy; Adipose Tissue.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Ticiania Ferreira Larocca •

Av. São Rafael, 2152, São Marcos, CEP 41253-190, Salvador, BA – Brasil

E-mail: ticianiaferreira@cardiol.br, ticiania@cbtc-hsr.org

Artigo recebido em 03/07/12, revisado em 10/12/12, aceito em 21/12/12.

DOI: 10.5935/abc.20130058



## Introdução

A doença de Chagas, desencadeada após a infecção pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, representa um grave problema de saúde pública, afetando cerca de 18 milhões de pessoas na América Latina, com 200 mil novos casos por ano<sup>1</sup>. Estima-se que, nos países endêmicos, cerca de 20 mil pacientes morram a cada ano, por complicações associadas a cardiomiopatia chagásica crônica, para a qual ainda não existe uma terapêutica suficientemente eficaz. Por esses motivos, é de fundamental importância o estudo de novas alternativas terapêuticas para os pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, levando em consideração a sua alta prevalência e sua elevada morbimortalidade, além do grande impacto socioeconômico causado por essa doença.

Diversas pesquisas sobre o potencial terapêutico do transplante de células-tronco têm sido realizadas nos últimos anos, sobretudo na área das doenças cardiovasculares. Bocchi e cols.<sup>2</sup> estudaram o efeito de células mononucleares de medula óssea, em pacientes portadores de insuficiência cardíaca não isquêmica refratária, tendo sido evidenciada melhora de fração de ejeção, classe funcional e qualidade de vida. Também foi demonstrado anteriormente que o transplante de células da medula óssea singênicas causa a melhora da miocardite chagásica em camundongos cronicamente infectados por *T. cruzi*<sup>3</sup>, tendo como possível mecanismo de ação a indução de apoptose das células mononucleares do infiltrado inflamatório, com redução da inflamação e do percentual de fibrose. Apesar de estudo clínico piloto com a utilização de células mononucleares em portadores de miocardiopatia chagásica crônica ter sugerido benefícios<sup>4</sup>, esses dados não foram confirmados por ensaio clínico randomizado<sup>5</sup>. Desse modo, estudos em modelos animais devem ser desenvolvidos no sentido de investigar novos protocolos terapêuticos baseados em células-tronco.

As células-tronco mesenquimais (CTM), encontradas no estroma de vários órgãos, incluindo a medula óssea, vêm sendo intensamente estudadas quanto às suas características e ao seu potencial terapêutico em diversos modelos experimentais pela facilidade com que podem ser obtidas e expandidas *in vitro*. No trabalho de Guarita-Souza e cols.<sup>6</sup>, ratos Wistar com cardiomiopatia dilatada chagásica, com disfunção sistólica de ventrículo esquerdo, foram transplantados com cocultura de CTM e mioblastos esqueléticos, tendo sido observada, um mês após o transplante, importante melhora da função e dos diâmetros ventriculares.

Nesse contexto, o presente estudo testou a hipótese de que a terapia com células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo é capaz de reduzir inflamação e fibrose e melhorar a aptidão cardiorrespiratória em um modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica em camundongos.

## Métodos

### Animais

Trinta camundongos da linhagem C57BL/6 foram mantidos no biotério do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC) com água e comida *ad libitum*, sob condições

ideais de temperatura e luminosidade. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital São Rafael, em 1º de janeiro de 2010, sob o número 05/10. As manipulações foram feitas de acordo com as normas de manipulação de animais estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences Washington, D. C. 1996), respeitando os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### Infecção de camundongos por *T. cruzi*

Vinte camundongos da linhagem C57BL/6 com seis a oito semanas de idade foram inoculados por via intraperitoneal com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*<sup>7</sup>, obtidos do sobrenadante de cultura de células da linhagem LCC-MK2 infectadas. A avaliação da infecção aguda foi feita por meio da parasitemia periódica.

### Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

A linhagem de células-tronco do tecido adiposo (CTTA) humanas foi obtida a partir de material de descarte de lipoaspiração. Após incubação com collagenase (Blendzyme1, Roche), a preparação foi centrifugada, e as células foram cultivadas em meio DMEM acrescido de L-glutamina (2 mM/L), gentamicina (50 µg/mL), Hepes (10 mM) e 2 g/L de bicarbonato de sódio, enriquecido com 10% de soro fetal bovino, sendo mantidas em estufa a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. As CTTA foram isoladas de outras células mononucleares por sua capacidade de aderência ao plástico e de expansão, sendo posteriormente avaliadas quanto à expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo, potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica e estabilidade cromossômica, comprovando as suas características de células mesenquimais.

### Tratamento dos animais chagásicos crônicos

Cada camundongo C57BL/6, seis meses após a infecção por *T. cruzi*, foi transplantado com 1 x 10<sup>6</sup> CTTA humanas, por via intraperitoneal. O transplante foi repetido após trinta dias. O grupo controle de animais infectados foi tratado com meio DMEM, também por via intraperitoneal.

### Avaliação eletrocardiográfica

Após a indução de anestesia utilizando o sistema de isofluorano (0,5 a 2%), foi iniciada a aquisição dos registros eletrocardiográficos. Os registros de eletrocardiogramas foram adquiridos usando um equipamento Bio Amp PowerLab System (PowerLab 2/20; ADInstruments, Castle Hill, Australia), que permite o registro de sinais biológicos em animais com total isolamento elétrico. Os dados foram adquiridos e armazenados em computador, analisados no programa *Chart 5 for Windows* (Power Lab; ADInstruments, Castle Hill, Australia). As análises de ECG incluíram as medidas de frequência cardíaca, dos intervalos PR e QT corrigido e a avaliação quanto à presença de distúrbios de condução e arritmias. Para minimizar interferências, foi utilizado filtro de 0,1 a 1 Hz.

### Avaliação funcional por ergometria

Para os estudos de ergometria, foi utilizado o equipamento LE 8700 – CO (Panlab, Barcelona, Espanha), com fluxo de ar na câmara controlado por um trocador de gases (LE 400, Panlab). A amostra de gases foi levada por um circuito fechado ao analisador de gases (OXYLET 00, Panlab), sendo os dados enviados ao computador através de um amplificador contendo uma placa analógico-digital (ML 820, PowerLab, ADInstruments, Austrália). Os dados foram armazenados em computador para análise no programa *Chart 5 for Windows – Metabolism for PowerLab System*. Os animais foram colocados na esteira 20 minutos antes de iniciar o exercício. A velocidade inicial foi de 12 cm/s, com incrementos na velocidade de 6 cm/s a cada 5 minutos. Após 5 minutos, o animal passava para o segundo estágio, com velocidade de 18 cm/s, e assim sucessivamente. Os testes foram realizados até os animais entrarem em exaustão, permanecendo por 5 segundos ou mais na área de choque. Para minimizar interferências, foi utilizado filtro de 0,1 a 1 Hz. Os parâmetros avaliados foram tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final, estágio máximo alcançado, consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono.

### Avaliações histológica e morfométrica

Após eutanásia dos animais, os corações e fragmentos de músculo esquelético foram removidos e fixados em formalina 4%, para processamento histológico. Seções dos corações e dos músculos dos animais foram coradas por hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia de campo claro, para a contagem de células inflamatórias, ou por tricrômio de Masson, para avaliação do percentual de fibrose. As quantificações foram realizadas em quatro cortes de 5 micrômetros de coração inteiro, com 20 a 30 micrômetros entre cada corte, depois de escaneamento utilizando o sistema Aperio ScanScope (Aperio Technologies, Vista, CA). As imagens foram analisadas com o programa Image Pro Plus (versão 7.0, Media Cybernetics, San Diego, CA).

### Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados considerando distribuição paramétrica, com o auxílio dos programas Graphpad Prism 5 (2007) e BioCalc. Para as comparações de intervalo PR, duração do QRS e frequência cardíaca foi utilizado o one-way ANOVA com pós-teste Tukey. O teste de Fisher foi utilizado para comparar os percentuais de animais com arritmias. O teste *t* não pareado foi utilizado na ergometria e na histopatologia para comparar os animais crônicos com os controles não infectados de mesma idade, e para comparar os animais chagásicos crônicos dos dois grupos. Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Mortalidade

O estudo foi iniciado com 30 camundongos da linhagem C57BL/6, divididos em três grupos: controles não infectados ( $n = 10$ ); chagásicos crônicos tratados com DMEM ( $n = 10$ );

e chagásicos crônicos tratados com CTTA ( $n = 10$ ). Não houve óbitos entre os animais não infectados e os tratados com DMEM. Foram observados dois óbitos no grupo de animais tratados com CTTA, e um deles ocorreu ainda em fase considerada pré-tratamento, por acidente hemorrágico abdominal durante a infusão intraperitoneal das células-tronco. O segundo óbito nesse grupo ocorreu cerca de um mês após o transplante das CTTA, por causa não identificada. Não houve significância estatística no índice de sobrevivência entre os grupos.

### Resultados eletrocardiográficos

Na análise dos intervalos eletrocardiográficos, não houve diferença com significância estatística entre os animais chagásicos dos dois grupos de animais chagásicos, quando comparados entre si. Houve significância estatística, com  $p < 0,001$ , quando comparado o intervalo PR dos animais não infectados com os animais chagásicos tratados com DMEM ou com CTTA, o que não ocorreu com o intervalo QTc. Não houve influência da terapia com CTTA no prolongamento do intervalo PR, quando avaliado esse grupo nas fases pré e pós-tratamento. Os intervalos PR e QTc permaneceram estáveis nos dois grupos de animais chagásicos durante todo o período avaliado (Tabela 1).

Na avaliação quanto à presença de arritmias cardíacas, dentre os animais chagásicos tratados com DMEM, dois animais evoluíram com BAVT. Três animais desse grupo já tinham BAVT na fase pré-tratamento, e dois passaram a cursar concomitantemente com frequentes extrassístoles ventriculares na fase pós-tratamento.

Entre os camundongos tratados com CTTA, três animais tinham BAVT, na fase pré-tratamento, e um deles apresentou reversão da arritmia, passando a ter ritmo sinusal, o que não ocorreu em nenhum dos animais tratados com DMEM. De quatro animais do grupo CTTA com ECG normal, um evoluiu com BAV de 2º grau tipo II e três animais evoluíram com BAVT.

As diferenças entre os percentuais de arritmias em geral e de BAVT não atingiram significância estatística quando comparados os grupos tratados com DMEM ou com CTTA. Também não se observou diferença quando os grupos foram comparados entre si nos dois tempos de infecção, apesar de ter sido observada uma tendência ao aumento de arritmias nos dois grupos estudados. Para arritmias em geral, os percentuais foram de 57% e 71% nos animais tratados com DMEM, e de 33% e 78% nos animais tratados com CTTA, nas fases pré- e pós-tratamento, respectivamente. Para BAVT, os percentuais foram de 43% e 71% nos animais tratados com DMEM, e de 33% e 56% nos animais tratados com CTTA, nas fases pré e pós-tratamento, respectivamente (Figura 1).

### Resultados da avaliação funcional ergoespirométrica

Em relação aos parâmetros de tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final e estágio máximo alcançado, não houve diferença com significância estatística entre os animais chagásicos dos dois grupos, quando comparados um com o outro, ou quando considerados isoladamente, nas fases pré- e pós-tratamento. Todos os parâmetros foram significativamente diferentes entre os

Tabela 1 – Valores de intervalo PR em QTc em ms nos grupos controle, DMEM e CTTA

|          | Controles   | Pré-tratamento |             | Pós-tratamento |            |
|----------|-------------|----------------|-------------|----------------|------------|
|          |             | DMEM           | CTTA        | DMEM           | CTTA       |
| PR (ms)  | 53,3 ± 5,8* | 82,5 ± 2,6     | 81,5 ± 20,5 | 81,7 ± 12,6    | 95,0 ± 7,1 |
| QTc (ms) | 32,4 ± 8,1  | 30,6 ± 4,7     | 33,2 ± 7,4  | 29,3 ± 3,6     | 30,0 ± 5,9 |

$p < 0,001$  para a comparação dos valores de intervalo PR dos animais não infectados com os animais chagásicos dos dois grupos. Demais resultados sem significância estatística; PR: intervalo entre as ondas P e R do eletrocardiograma; QTc: intervalo corrigido entre as ondas Q e T do eletrocardiograma; DMEM: Meio Eagle modificado por Dulbecco; CTTA: células tronco derivadas de tecido adiposo.

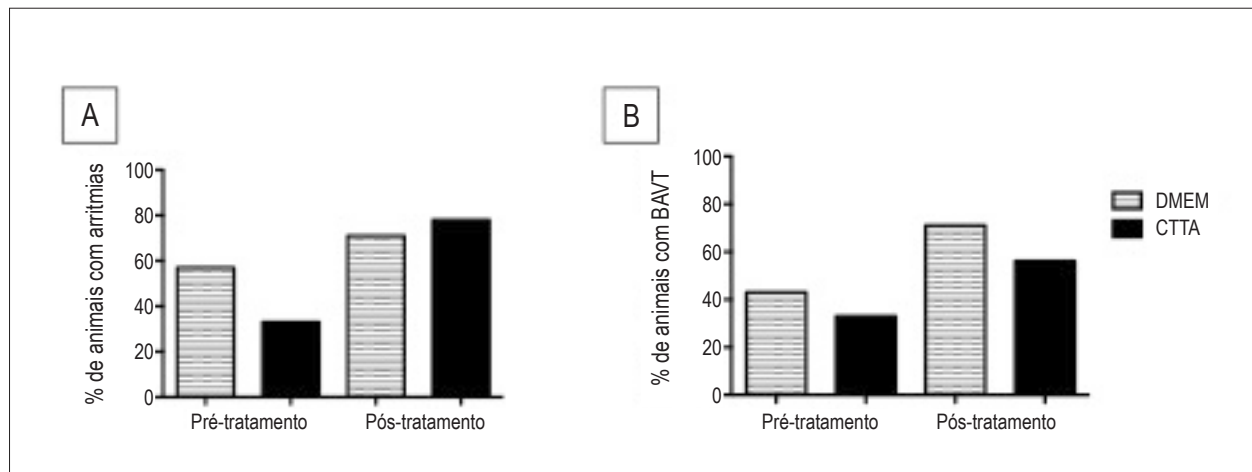


Figura 1 – Avaliação de arritmias em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTA) nas diferentes fases do tratamento. Percentual de arritmias (A) e BAVT (B) nos camundongos chagásicos nas fases pré- (6 m.p.i) e pós-tratamento (8 m.p.i). Resultados expressos em percentuais com 7 dos animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA; BAVT: Bloqueio atrioventricular total.

animais não infectados e os chagásicos em geral. O tempo de exercício, em segundos, foi  $2577 \pm 371$  nos animais não infectados;  $1840 \pm 342$  e  $1620 \pm 690$  nos animais do grupo DMEM nas fases pré e após 2 meses de tratamento, respectivamente; e de  $1570 \pm 436$  e  $1278 \pm 454$  nos animais do grupo CTTA nas fases pré e pós-tratamento, respectivamente. A distância percorrida, em metros, foi  $730 \pm 187$  nos animais não infectados;  $396 \pm 127$  e  $342 \pm 171$  nos animais do grupo DMEM nas fases pré e após dois meses de tratamento, respectivamente; e de  $358 \pm 131$  e  $221 \pm 125$  nos animais do grupo CTTA nas fases pré e pós-tratamento, respectivamente (Figura 2).

O grupo DMEM evoluiu, após o primeiro mês, com aumento do  $VO_2$ , sendo esse valor mantido após o segundo mês de observação. O grupo CTTA apresentou uma tendência a elevação do  $VO_2$  após o tratamento, porém sem significância estatística.

Quanto à produção de dióxido de carbono, observamos um aumento do  $VCO_2$  em repouso no grupo DMEM após o primeiro mês, mas não no grupo CTTA. Houve uma queda acentuada no  $VCO_2$  em repouso e no pico do esforço após o segundo mês nos grupos DMEM e CTTA, com significância estatística, quando comparados com o primeiro mês pós-tratamento.

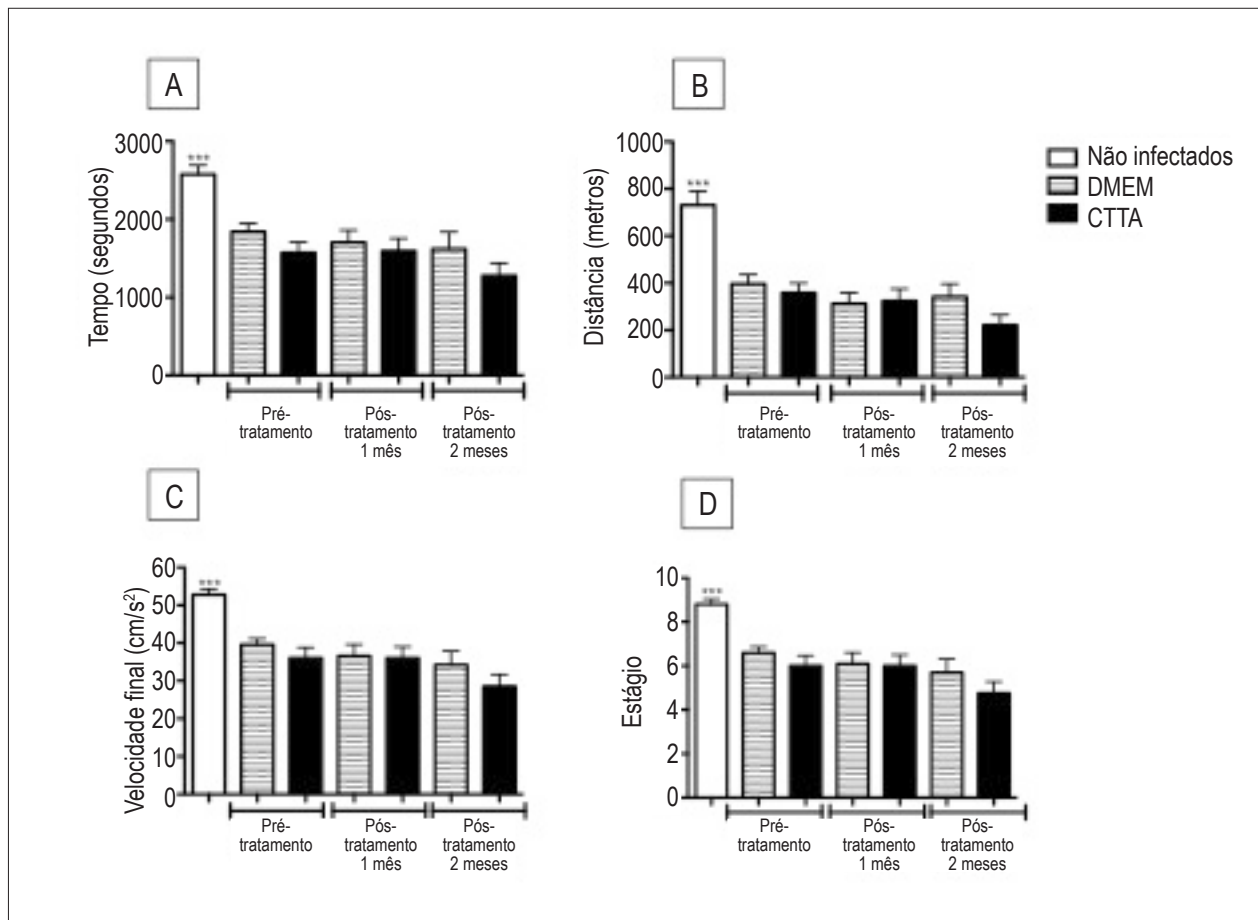
O  $VO_2$  em repouso, em mL/Kg/min, foi  $3959 \pm 830$  nos animais não infectados;  $2779 \pm 1004$  e  $3925 \pm 1158$  nos animais do grupo DMEM nas fases pré- e após dois

meses de tratamento, respectivamente; e de  $3442 \pm 770$  e  $4094 \pm 1203$  nos animais do grupo CTTA nas fases pré- e pós-tratamento, respectivamente. No pico do esforço, esses valores foram  $6107 \pm 983$  nos animais não infectados;  $4213 \pm 1438$  e  $5540 \pm 1088$  nos animais do grupo DMEM nas fases pré- e após dois meses de tratamento, respectivamente; e de  $5479 \pm 1061$  e  $5000 \pm 1475$  nos animais do grupo CTTA nas fases pré e pós-tratamento, respectivamente. O  $VCO_2$  em repouso, em mL/Kg/min, foi  $3716 \pm 1113$  nos animais não infectados e  $3544 \pm 472$  e  $1779 \pm 1222$  nos animais do grupo DMEM nas fases pré- e após dois meses de tratamento, respectivamente; e de  $3988 \pm 366$  e  $1993 \pm 1784$  nos animais do grupo CTTA nas fases pré- e pós-tratamento, respectivamente. No pico do esforço, esses valores foram  $5171 \pm 1454$  nos animais não infectados;  $4894 \pm 880$  e  $2393 \pm 1610$  nos animais do grupo DMEM nas fases pré- e após dois meses de tratamento, respectivamente; e de  $5261 \pm 688$  e  $2425 \pm 1802$  nos animais do grupo CTTA nas fases pré- e pós-tratamento, respectivamente (Figura 3).

#### Avaliações histológicas e morfológicas

Seções de corações de camundongos chagásicos crônicos apresentaram alterações histológicas características da cardiomiopatia chagásica crônica (Figura 4). Observa-se a presença de infiltrados inflamatórios focais e disseminados compostos predominantemente por células mononucleares,





**Figura 2** – Avaliação dos dados ergométricos em animais não infectados e chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTA) nas diferentes fases do tratamento. (A) Tempo de exercício. (B) Distância percorrida. (C) Velocidade final alcançada. (D) Estágio máximo atingido. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão de 10 dos animais não infectados, 7 dos animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

miocitólise, mionecrose e fibrose. Ambos os grupos (tratados com DMEM ou CTTA) apresentaram padrão semelhante, porém o grau de inflamação e de fibrose nos corações de animais tratados com CTTA foi menor do que os tratados com DMEM.

Na figura 4A, um corte de coração normal, com coloração tricrômio de Masson, mostra uma estrutura arteriolar, com colágeno circunjacente a ela (corado em azul), fibras cardíacas normais e ausência de infiltrado inflamatório. A figura 4B mostra corte de coração chagásico crônico tratado com DMEM, com coloração tricrômio de Masson, evidenciando intenso infiltrado inflamatório multifocal produzido por células mononucleares, frequentemente aderidas a fibras cardíacas, produzindo lesões miocitolíticas nelas, sendo a área inflamada entremeada por intensa fibrose (corada em azul). Na figura 4C, observa-se corte de coração chagásico crônico tratado com CTTA, com coloração por tricrômio de Masson, com discretos infiltrados focais compostos por células mononucleares, sendo as áreas inflamadas entremeadas por discreta fibrose (corada em azul).

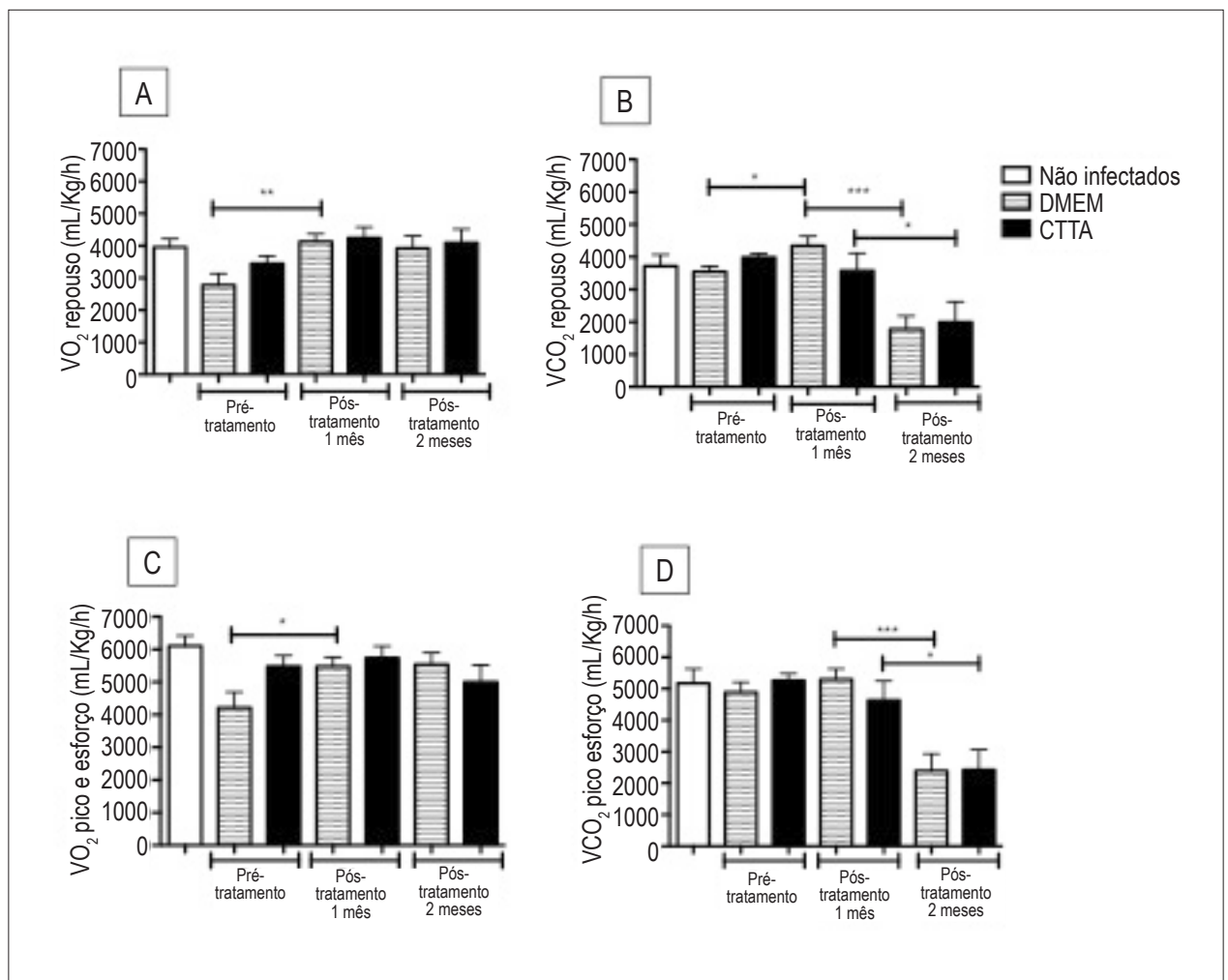
Ao avaliar por morfometria a inflamação e fibrose de forma comparativa entre os dois grupos de animais chagásicos, observamos uma redução de fibrose e inflamação

nos animais tratados com CTTA, com significância estatística. O número de células inflamatórias por  $\text{mm}^2$  foi de  $228,5 \pm 80,4$  nos animais não infectados; de  $758,4 \pm 194,7$  nos animais do grupo DMEM; e de  $382,4 \pm 91,9$  nos animais do grupo CTTA. O percentual de fibrose no coração foi de  $2,60 \pm 1,78$  nos animais não infectados; de  $8,95 \pm 3,31$  nos animais do grupo DMEM; e de  $3,89 \pm 1,14$  nos animais do grupo CTTA (Figura 5).

Além do coração, foi realizada a avaliação histopatológica de músculo esquelético. Tanto os animais chagásicos tratados com DMEM quanto os com CTTA apresentaram inflamação no músculo esquelético, caracterizando uma mioosite intensa observada na fase crônica da doença (dados não mostrados).

## Discussão

Neste trabalho, foi demonstrada redução de inflamação e fibrose no coração de camundongos com miocardiopatia chagásica, induzida pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*, tratados com CTTA. Estudos anteriores haviam demonstrado dados semelhantes, porém com a utilização de células mononucleares de medula óssea<sup>3</sup>. A despeito disso, o tratamento com as CTTA não influenciou o desenvolvimento



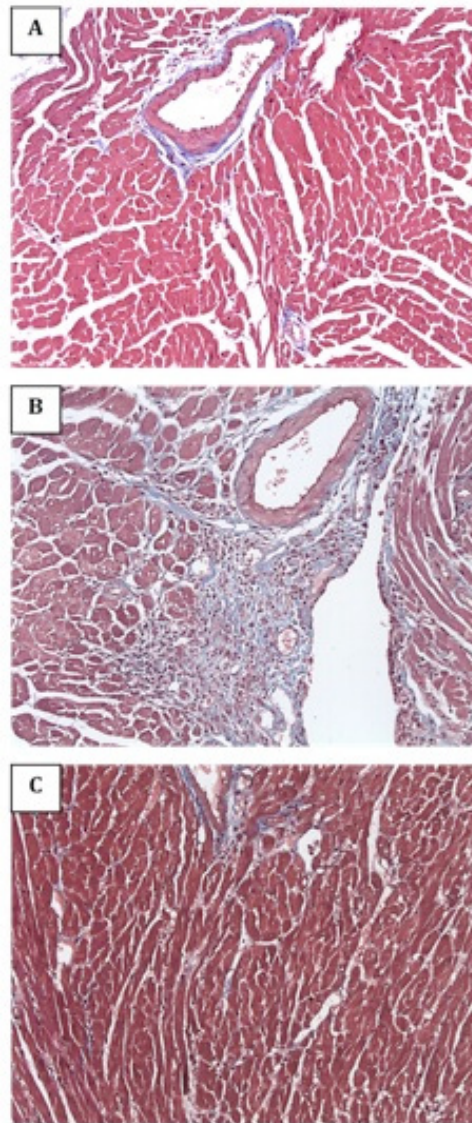
**Figura 3** – Avaliação de  $VO_2$  e  $VCO_2$  em animais não infectados e em chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTA) nas diferentes fases do tratamento.  $VO_2$  de repouso (A) e de pico do esforço (C).  $VCO_2$  de repouso (B) e de pico do esforço (D). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão de 10 dos animais não infectados, 7 dos animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,001$ . \*\*\*  $p < 0,0001$ .

de arritmias cardíacas e também não propiciou melhora dos parâmetros ergométricos, tendo sido mantida a baixa tolerância ao exercício com a progressão da doença.

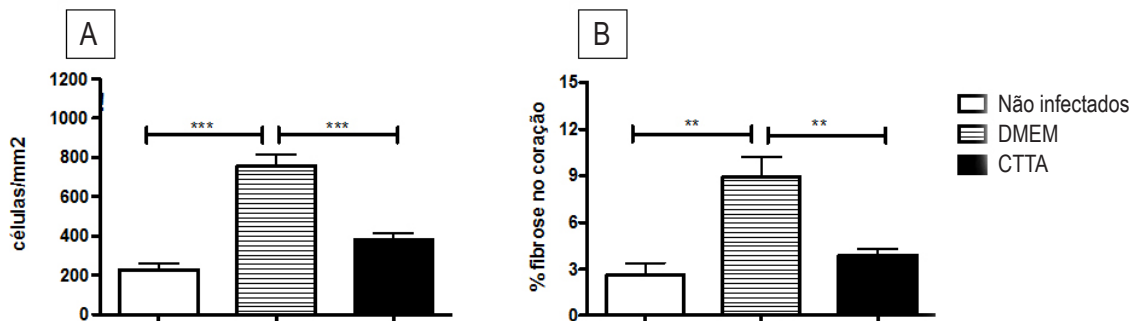
Os efeitos benéficos da terapia com células mesenquimais, através do seu potencial regenerativo, já foram demonstrados em diversos estudos clínicos e experimentais, como em doenças dos tecidos ósseo e cartilaginoso<sup>8</sup>, insuficiência renal<sup>9</sup>, doenças cardiovasculares<sup>10</sup>, pulmonares<sup>11</sup>, dentre outras. Além do potencial regenerativo, foi identificada ainda a atividade imunossupressora dessas células<sup>12,13</sup>, que são capazes de modular a função dos linfócitos T, fundamentais para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Portanto, é possível que os efeitos das CTTA na redução de fibrose e inflamação observados neste trabalho se devam a essa propriedade imunomoduladora, já descrita em diversos trabalhos na literatura. O fato de não ter sido evidenciada redução no percentual de arritmias sugere que pode não ter havido uma regeneração do tecido e/ou recuperação do sistema de condução cardíaco após a utilização desse esquema terapêutico, ao menos no tempo pós-tratamento avaliado.

No trabalho de Guarita-Souza e cols.<sup>6</sup>, ratos Wistar foram infectados com  $15 \times 10^4$  tripomastigotas, desenvolvendo cardiomiopatia dilatada com disfunção sistólica de ventrículo esquerdo. Esses animais foram transplantados com cocultura de CTM e mioblastos esqueléticos, tendo sido observada, já após um mês do transplante, importante melhora da função e dos diâmetros ventriculares. A utilização de outro tipo celular juntamente com as CTM torna difícil avaliar o real papel das CTM neste modelo. É possível que os mioblastos esqueléticos atuem na recolonização das áreas fibróticas, promovendo, assim, a melhora da função cardíaca.

Em relação ao tipo celular utilizado em nosso estudo, algumas vantagens da utilização das células-tronco derivadas de tecido adiposo para o tratamento de doenças cardíacas em relação às de medula óssea já foram descritas anteriormente<sup>14</sup>, bem como a sua capacidade de diferenciação em cardiomiócitos<sup>15,16</sup>. Quanto à utilização de células xenogênicas (células humanas em camundongos), estudos prévios já demonstraram a segurança e a potencial



**Figura 4** – Histologia de seções de corações de camundongos eutanasiados dois meses após a terapia celular. (A), Animal não infectado. (B), Animal chagásico crônico tratado com DMEM. (C), Animal chagásico crônico tratado com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTA). Seções coradas com tricrômio de Masson. Aumento: 200 x.



**Figura 5** – Avaliação morfométrica de seções de corações de animais não infectados e de chagásicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA). (A) Número de células inflamatórias por mm<sup>2</sup> quantificado em seções coradas com H&E. (B) Percentual de fibrose quantificado em seções coradas com tricrômio de Masson. Resultados expressos em média ± erro padrão de 5 animais não infectados, 6 animais do grupo DMEM e 8 animais do grupo CTA. \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,0001$ .

eficácia dessas células, como o artigo publicado por Cai e cols.<sup>17</sup> em modelo de infarto do miocárdio em ratos. Do mesmo modo, Hwangbo e cols.<sup>18</sup> avaliaram o efeito do transplante de CTTA humanas em ratos Sprague-Dawley com infarto do miocárdio, com evidência de significativa melhora de função ventricular esquerda.

Em nosso estudo, optamos pela utilização da via intraperitoneal pelo fato de termos evidenciado em estudos anteriores a perda de animais por óbito após a administração de CTM por via endovenosa em camundongos. Em um trabalho realizado com insuficiência cardíaca refratária não isquêmica, foram utilizadas as vias endovenosa e intracoronariana, com resultados satisfatórios, porém as células estudadas foram as mononucleares, e não as mesenquimais<sup>2</sup>. Também utilizando células mononucleares de medula óssea, Nakamuta e cols.<sup>19</sup> demonstraram maior retenção cardíaca das células, em modelo experimental de infarto do miocárdio, quando utilizada a via intramuscular. No entanto, Furlani e cols.<sup>20</sup> avaliaram, por microscopia intravital, a cinética de migração de CTM humanas após a administração intravascular em camundongos SCID, através de um cateter inserido na aorta abdominal infrarrenal. Neste trabalho, o tamanho das CTM variou de 16 a 53  $\mu\text{m}$  em suspensão, tendo sido observada interferência na microcirculação sanguínea conforme a densidade celular, com interrupção do fluxo sanguíneo e formação de trombo em arteríolas e vênulas nos animais nos quais foram injetadas as CTM. Em outro estudo, Gordon e cols.<sup>21</sup> demonstraram o efeito terapêutico da injeção por via intraperitoneal de células-tronco mesenquimais humanas em camundongos com encefalomielite alérgica autoimune. Assim, além de não causar a perda de animais por embolia, esses trabalhos indicam que a via intraperitoneal de administração pode não comprometer os efeitos dessas células.

Uma limitação deste trabalho foi um viés na avaliação da ergometria causado pela presença de inflamação no músculo esquelético observada nos animais chagásicos. Mesmo nos animais que não apresentaram BAVT, observamos um pior desempenho no teste ergométrico, especialmente nos parâmetros de tempo de exercício e distância percorrida, além de claudicação de marcha. Ao avaliar a histologia e a morfometria de seções de músculo esquelético, encontramos uma grande quantidade de células inflamatórias, caracterizando miosite, considerada como fator ortopédico limitante para a progressão do esforço nos animais chagásicos no nosso trabalho. Em outro protocolo, estamos avaliando os efeitos da terapia com baixas doses de benzonidazol na miosite esquelética em camundongos cronicamente

infetados por *T. cruzi* submetidos ao transplante com células-tronco mesenquimais cardíacas.

## Conclusão

Em resumo, este trabalho contribuiu para a avaliação os efeitos da terapia com CTTA na forma arritmica da doença de Chagas, tendo demonstrado que o tratamento com as CTTA não reduziu a incidência de arritmias cardíacas em camundongos cronicamente infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. Os animais tratados tiveram uma redução de inflamação e fibrose, com valores semelhantes àqueles encontrados em animais não infectados, quando realizada a avaliação histológica e morfométrica. Novos estudos poderão contribuir para o desenvolvimento de protocolos, com ajuste da terapia e do modelo experimental, até que possa ser desenvolvida uma abordagem terapêutica suficientemente eficaz, que justifique futuros estudos em pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Larocca TF, Souza BSF, Soares MBP, Ribeiro-dos-Santos R; Obtenção de dados: Larocca TF, Souza BSF; Análise e interpretação dos dados: Larocca TF, Souza BSF, Macambira SG; Análise estatística: Larocca TF; Obtenção de financiamento: Soares MBP, Ribeiro-dos-Santos R; Redação do manuscrito: Larocca TF, Soares MBP; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Macambira SG, Soares MBP, Ribeiro-dos-Santos R; Acompanhamento veterinário dos animais: Silva CA, Preparo das células presenquimais: Kaneto CM; Análise dos perfis de citocinas e quimiocinas: Alcântara AC; Realização de análise por imunofluorescência e parasitemia: Azevedo CM; Realização de exames complementares nos animais: Castro MF.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pelo CNPq, FAPESB e FINEP.

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Ticiane Ferreira Larocca pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz.

## Referências

1. Rassi AJr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006;355(8):799-808.
2. Bocchi EA, Bacal F, Guimarães G, Mendroni A, Mocelin A, Filho AE, et al. Granulocyte-colony stimulating factor or granulocyte-colony stimulating factor associated to stem cell intracoronary infusion effects in non ischemic refractory heart failure. *Int J Cardiol*. 2010;138(1):94-7.
3. Soares MB, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, de Carvalho AC, et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol*. 2004;164(2):441-7.
4. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Mota A, Pinho-Filho JA, Almeida AJ, et al. [Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease]. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(2):159-66.

## Artigo Original

- Ribeiro Dos Santos R, Rassi S, Feitosa G, Grecco OT, Rassi A Jr, da Cunha AB, 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*. 2012;125(20):2454-61.
- Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Woitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):1120-4.
- 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;13:272-80.
- Larsen KH, Andersen TE, Kassem M. [Bone and cartilage repair using stem cells]. *Ugeskr Laeger*. 2010;172(38):2616-9.
- Choi S, Kim J, Hwang S. Mesenchymal stem cell therapy for chronic renal failure. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(8):1217-26.
- Boyle AJ, McNiece IK, Hare JM. Mesenchymal stem cell therapy for cardiac repair. *Methods Mol Biol*. 2010;660:65-84.
- Hackett TL, Knight DA, Sin DD. Potential role of stem cells in management of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2010;5:81-8.
- Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol*. 2007;28(5):219-26.
- Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010;28(3):585-96.
- Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells - basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25(4):818-27.
- Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004;94(2):223-9.
- Zhu Y, Liu T, Song K, Ning R, Ma X, Cui Z. ADSCs differentiated into cardiomyocytes in cardiac microenvironment. *Mol Cell Biochem*. 2009;324(1-2):117-29.
- Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen PS, et al. IFATS collection: human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*. 2009;27(1):230-7.
- Hwangbo S, Kim J, Her S, Cho H, Lee J. Therapeutic potential of human adipose stem cells in a rat myocardial infarction model. *Yonsei Med J*. 2010;51(1):69-76.
- Nakamuta JS, Danoviz ME, Marques FL, dos Santos L, Becker C, Gonçalves GA, et al. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. *PLoS One*. 2009;4(6):e6005.
- Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res*. 2009;77(3):370-6.
- Gordon D, Pavlovska G, Glover CP, Uney JB, Wraith D, Scolding NJ. Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. *Neurosci Lett*. 2008;448(1):71-3.