UFRRJ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO

COMUNICAÇÃO JUNCIONAL EM MACRÓFAGO: PAPEL E MODULAÇÃO DA JUNÇÃO COMUNICANTE NO MICROAMBIENTE DA INFECÇÃO

Gabriella Oliveira Alves Moreira de Carvalho

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

COMUNICAÇÃO JUNCIONAL EM MACRÓFAGO: PAPEL E MODULAÇÃO DA JUNÇÃO COMUNICANTE NO MICROAMBIENTE DA INFECÇÃO

GABRIELLA OLIVEIRA ALVES MOREIRA DE CARVALHO

Sob a Orientação do Professor Doutor
Fabio da Silva de Azevedo Fortes

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências,** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

GABRIELLA OLIVEIRA ALVES MOREIRA DE CARVALHO

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Fisiologia e Farmacologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/2017

_____
Professor Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes (UEZO)
(Orientador)

_____
Profª Drª Norma Aparecida dos Santos Almeida (Membro Interno – UFRRJ)

_____
Prof Dr Sergio Henrique Seabra (Membro Externo – UEZO)

_____
Prof Dr Emerson Lopes Olivares (Suplente Interno – UFRRJ)

_____
Profª Drª Jéssica Manya Bittencourt Dias Vieira (Suplente Externa – UEZO)

Dedicatória

Dedico este trabalho a **Deus** que tem sido fiel a mim em todos os detalhes!

Aos meus pais, **Celso Moreira de Carvalho** e **Ana Beatriz de Oliveira Alves Maciel Carvalho**, e a minha irmã **Isabella Oliveira Alves Moreira de Carvalho**, por ter me ajudado a chegar ao nível que cheguei.

Vocês são as joias mais preciosas que possuo e minha inspiração para seguir sempre em frente e conquistar meus objetivos! Obrigada por todo o amor, dedicação, apoio e compreensão empenhados a mim. Amo vocês!

Agradecimento

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus** por ser o meu sustento a cada dia. Desde o início tem me orientado em cada passo que dou e me mantendo firme, com força e saúde para superar e vencer. Todos as objetivos alcançados foram através da sua mão e o cuidado.

Aos meus pais, por quem tenho muito amor! Obrigada por sempre terem me aconselhado a prosseguir. Por terem lutado para me dar um futuro próspero, fazendo o possível e o impossível para estar junto a mim em todos os detalhes me ajudando. Se hoje eu venci mais esta etapa é porque tenho vocês ao meu lado sendo os modelos de pessoas boas, honestas, humildes, amáveis e alegres. Vocês são as minhas fonte de inspiração para a vida.

A minha irmã Isabella, obrigada por toda a alegria que você traz a minha vida. Minha melhor amiga e companheira de todas as horas, dividindo as alegrias e tristezas. Sempre juntas para vencer as adversidades da vida e me ajudando a manter o máximo de calma possível nos momentos mais complicados. Hoje nos podemos comemorar mais uma de muitas vitória juntas.

A minha querida Avó, Beatriz Saião de Oliveira, que tem sido presente em toda a minha vida, me dando amor, apoio e orações. Meu amor por você é enorme e fico muito feliz em te dar mais este orgulho.

Ao Sidney, meu namorado, obrigada pelo seu amor que me traz muita alegria e esperança. Você me completa e me faz muito feliz te ter ao meu lado. Sua paciência, seu carinho e atenção foram fundamentais neste momento de conclusão, assim como em todo o processo. Ainda iremos alcançar muitas coisas juntos, apoiando um ao outro.

Ao Profº Fábio Fortes, que foi mais que um orientador, dividindo momentos de tensão e descontração. Se mostrando um exemplo de atenção, administração, disciplina e honestidade, me dando muito apoio em todo o processo. Obrigada por me passar lições valiosas sobre o meio que amo estar: o da Pesquisa, além de me ensinar e dar valiosas dicas sobre a docência.

Aos meus amigos do laboratório LTFCM, Camila Moura que entrou neste desafio junto comigo para vencer! Ao Thiago Manchester que também me deu dicas valiosas e momentos muitos engraçado mesmo nas horas mais tensas. A Maria Rita, Julia Macedo, Ricardo Ramada, Daniel Rodrigues e especialmente Olga Maria, que tiveram uma atenção especial comigo nesta reta final, me dando apoio e ajudando a lutar pelo melhor sem esquecer os detalhes. Vencemos juntos muitos problemas sem desistir dos nossos sonhos.

Ao Profº Sérgio Seabra, com que tive o prazer de iniciar a carreira cientifica e me ajudou sempre que foi necessário, sendo fundamental para este trabalho fornecendo os protozoários *Toxoplasma gondii*.

A Professora Regina Goldemberg pelo suporte para realização deste trabalho fornecendo os anticorpos. Ao professor Antonio Campos de Carvalho por abrir as portas para a realização do experimento de microinjeção de corante. Ao professor Robson Coutinho que forneceu as citocitas necessárias. A Doutora Cherley que sempre esteve disposta a me ajudar e me socorreu nesta reta final. O suporte de vocês foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Aos meu amigos do LTFCM e LTCC que estiveram caminhando comigo, mas em especial agradeço a Thatiana Guinâncio, ao Thiago Santos e a Juliana Portes que também me acompanham desde o início da carreira. Obrigada pela disposição em me auxiliar sempre que necessário. Com vocês eu aprendi muito.

Aos meus amigos Rômulo, Cláudio, Fabiana e Raquel, que estiveram me orientando e ajudando em diferentes momentos desse processo, espero manter esta nossa parceria.

Agradeço aos docentes e discentes do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, que muito me ensinaram. E o conhecimento é um tesouro!

Aos meus amigos de FIFA, conseguimos!!!!

RESUMO

COMUNICAÇÃO JUNCIONAL EM MACRÓFAGO: PAPEL E MUDULAÇÃO DA JUNÇÃO COMUNICANTE NO MICROANBIENTE DA INFECÇÃO

Toxoplasma gondii (*T. gondii)* é o protozoário intracelular obrigatório responsável pela toxoplasmose, e acredita-se que este parasita tenha infectado um terço da população mundial causando grande morbidade e mortalidade.(Mahmoudi *et al*; 2017) As junções comunicantes são canais transmembrana que permitem a comunicação direta nos tecidos (DHEIN, 1998) e estas junções possuem um papel de destaque em estudos associados às infecções parasitárias.(CAMPOS DE CARVALHO *et al*, 1998) Os canais juncionais são responsáveis pela troca de íons e pequenos mensageiros que mantém a homeostase tecidual (Adesse, *et al*., 2011), no entanto, ainda existem sistemas que não estão inteiramente caracterizados a respeito da comunicação juncional. Dentre eles podemos destacar o sistema Imunológico, particularmente os Macrófagos que participam do processo de resposta inata. A caracterização morfológica e funcional das junções comunicantes em macrófagos tem sido alvo de estudo de diversos grupos (Fortes *et al*., 2004), no entanto seus mecanismos regulatórios ainda merecem esclarecimentos, principalmente diante de alterações patológicas, como nos processos infecto-inflamatórios. Diante disto, o objetivo principal deste estudo é avaliar a modulação estrutural e funcional das junções comunicantes formadas pela Conexina 43 (Cx43) em linhagens macrofágicas tratadas com fatores pró-imune-inflamatórios e após a infecção com o *Toxoplasma gondii*. A metodologia utilizada foi: (1) Cultura de células de linhagem macrofágica J774-G8; (2) Ensaios imunoeletroforéticos de Western Blot; (4) Ensaios de imunofluorescência e análise por microscopia confocal; e (5) Ensaios de microinjeção intracelular de corantes. As culturas de células foram ativadas com fatores pró-imune inflamatórios (Fator de Necrose Tumoral-α (TNF$-\alpha$) e Interferon-γ (IFN-γ)) ou infectadas com o toxoplasma de cepa RH em sua forma taquizoíta. Os resultados revelaram que as células J774-G8 apresentaram alterações significativas em seu crescimento e perfil de comunicação juncional em experimentos de injeção de corantes, quando submetidas a microambientes com fatores pró-imune inflamatórios combinados (LPS+IFN-γ e IFN-γ + TNF-α) em incubações de até 72 horas. Imagens de imunofluorescência confocal evidenciaram marcação para proteína conexina 43, faloidina (marcador de filamentos de actina) em células de linhagem macrofágica J774-G8, demonstrando uma possível co-localização entre as proteicas Cx43 e actina pela primeira vez em células de linhagem macrófagica. Já as imagens de imunofluorescência confocal marcadas para proteína Cx43, faloidina em células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii*, mostraram a significativa diminuição da marcação para faloidina e consequentemente a falta da marcação para Cx43. Os ensaios imunoeletroforeticom evidenciaram o almento da expressão de Cx43 da linhagem celular macrofágica infectadas comparadas ao controle. Concluindo que As células da linhagem macrofágica J774-G8 tratadas com fatores pró-imuno inflamatórios combinados apresentaram alterações no crescimento celular e as células tratadas com fatores combinados apresentaram sua comunicação juncional modulada positivamente. As células da linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii* apresentaram não só alterações no crescimento celular, como também demonstraram alterações morfológicas, acompanhadas de morte celular; A expressão proteica, por transferência imunoeletroforética, da Cx43 se demonstrou alterada (aumentada) em células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas por 24 e 48 horas com o parasita *Toxoplasma gondii*, quando comparadas com as células não infectadas; As proteínas Cx43 e Faloidina interagem na membrana plasmática de linhagem macrofágica J774-G8 não infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii*, mas sofrem uma sensível redução na membrana após 72 horas de infecção.

Palavras chave: Macrófago, Junção comunicante, *Toxoplasma gondii.*

Abstract

JUNCTION COMMUNICATION IN THE IMMUNE SYSTEM: MODULATION OF THE GAP JUNCTION BY INFECTION WITH *TOXOPLASMA gondii* AND INFLAMMATION CONDICTION.

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite responsible for toxoplasmosis, and it's believed that this parasite has infected one-third of the world population. In immunocompromised individuals toxoplasmosis may be cause problems in the central nervous and visual systems. Some of these complications are associated with the change of intercellular communication mediated by Junctions Communicators. However, there are still systems that aren't fully characterized regarding the junctional communication, including the innate immune system, represented by Macrophages. In view of this, the aim of this study is to evaluate the structural and functional modulation of gap junctions formed by Connexin 43 (Cx43) in macrophage lines and peritoneal macrophages after infection with Toxoplasma gondii, and treatments with pro-immune-inflammatory factors. The methodology used is: (1) J774-G8 macrophage cell line culture; (2) Primary culture of peritoneal macrophages of Swiss mice; (3) Western Blot Assays; (4) Immunofluorescence assays and analysis by confocal microscopy; and (5) Intracellular dye microinjection (functional assessment of gap junctions). The results showed that J774-G8 cells presented significant changes in their growth and junctional communication profile in dye injection experiments when submitted to microenvironments with combined inflammatory pro-immune factors (LPS + IFN-γ and IFN-γ + TNF -□) in incubations of up to 72 hours. Confocal immunofluorescence images showed marking for connexin 43 protein, phalloidin (actin filament marker) in J774-G8 macrophage cells, demonstrating a possible co-localization between Cx43 and actin proteins for the first time in macrophage lineage cells. On the other hand, confocal immunofluorescence images labeled for Cx43, phalloidin protein in *T. gondii* infected J774-G8 macrophages have shown a significant decrease in phalloidin labeling and consequently lack of Cx43 labeling. Immunoelectrophoresis assays showed the expression of Cx43 expression of the infected macrophage cell line compared to control. Concluding that J774-G8 macrophage cells treated with combined pro-inflammatory factors showed alterations in cell growth and cells treated with combined factors presented their positively modulated junctional communication. The cells of the J774-G8 macrophage line infected with the Toxoplasma gondii parasite showed not only alterations in cell growth, but also demonstrated morphological alterations, accompanied by cell death; Protein expression, by immunoelectrophoretic transfer, of Cx43 was altered (increased) in J774-G8 macrophage cells infected with the parasite Toxoplasma gondii for 24 and 48 hours compared to uninfected cells; The Cx43 and Phalloidin proteins interact in the J774-G8 macrophage plasma membrane uninfected with the parasite Toxoplasma gondii, but suffer a significant reduction in the membrane after 72 hours of infection.
Key Words: Gap junction, Macrophages and *Toxoplasma gondii.*

LISTA DE FIGURAS

1. Mapa do Brasil com 5 regiões e distribuição da população humana, demonstrando fontes de *Toxoplasma gondii* isolados genotipados. 5
2. Organização esquemática descrevendo o ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. 8
3. Esquema do ciclo sexual do *T. gondii* 10
4. Desenho esquemáticos de um taquizoíto e um bradizoíto de T. gondii. 13
5. Diagrama simplificado do processo de divisão do *Toxoplasma gondii* por endodiogenia 15
6. Desenho Esquemático do esporozoíto 18
7. Esquema da organização dos canais juncionais na membrana plasmática 22
8. Organização topológica da proteína juncional (conexina) na membrana plasmática 23
9. Tipos de conexons e canais juncionais formados por associação de conexinas iguais ou diferentes 25
10. Tipo de canal juncional formado pela associação das conexinas 26
11. Compatibilidade heterotérica e heterotípica. 26
12. Esquema demonstrando a síntese, montagem e degradação das junções comunicantes dentro da célula 28
13. **:** Ilustração esquemática de três células acopladas em rede e condições fisiológicas. 29
14. Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções. A resposta imune adaptativa desenvolvesse posteriormente e consiste na ativação dos linfócitos. 35
15. Organização esquemática demonstrando a ativação do macrófago pelo IFN-g, 37
16. Micrografia eletrônica de um macrófago 39
17. Micrografias em contraste de fase das culturas J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios 24 horas 53
18. Micrografias em contraste de fase das culturas J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios 48 horas 54
19. Micrografias em contraste de fase das culturas J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios 72 horas 55
20. Micrografias em contraste de fase das culturas J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios 24 horas 57
21. Micrografias em contraste de fase das culturas J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios 48 horas 58
22. Micrografias em contraste de fase das culturas J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios 72 horas 59
23. Gráfico comparativo do número de grumos celulares nas culturas J774-G8 60
24. **:** O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 24 horas tratadas e injetadas com o corante 62
25. O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 48 horas tratadas einjetadas com o corante 63
26. O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 72 horas tratadas e injetadas com o corante 64
27. Micrografias de contraste de fase e fluorescência de culturas J774-G8 controle ou incubadas, injetadas com o corante 65
28. Micrografias em microscopia óptica de células J774–G8 controle e infectadas com *T. gondii* *67*

29. Micrografias em microscopia óptica de células J774–G8 controle e infectadas com *T. gondii* *69*
30. Imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal Controle 71
31. Imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal Infectada com *T. gondii* *73*
32. Imunoeletrotransferência de culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 75
33. Esquema demonstrando as proteínas que possivelmente estão envolvidas com a inserção da Cx43 na membrana plasmática. 83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1. Toxoplasmose 4
2.1.1. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* 6
2.1.2. Aspectos celulares básicos 11
2.1.2.1. O Taquizoíta 12
2.1.2.2. O Bradizoíta 16
2.1.2.3. O Esporozoíta 16
2.1.3. Aspectos clínicos da Toxoplasmose 18
2.2. Junções comunicantes 20
2.2.1. Formação das junções comunicantes 27
2.2.2. Função das Junções comunicantes 28
2.2.3. Propriedades das junções comunicantes 31
2.3. Sistema Imunológico e inflamação 34
2.4. Macrógafos 38
2.4.1. Macrófagos: Funções e interação celular 40
2.4.2. Macrófagos e Junções comunicantes 42
2.5. Junções comunicantes X Toxoplasmose 45

3. MATERIAIS E MÉTODOS 47
3.1. Cultura de células de linhagem macrofágica J774-G8 47
3.2. Obtenção de taquizoíta de *T. gondii* 47
3.3. Interação parasito-célula 47
3.4. Tratamento com fatores pro imuno-inflamatórios 48
3.5. Determinação da concentração de proteína 48
3.6. Imunoeletrotransferência 48
3.7. Imunofluorescência 50
3.8. Injeção de corante 51
3.9. Análise estatística 51

4. Resultados 52
4.1. Fatores pró-imunoinflamatórios: crescimento celular e aspectos morfológicos 52
4.2. Tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios: comunicação celular 61
4.3. Infecção com o *T. gondii*: crescimento celular e aspectos morfológicos 66
4.4. Infecção com o *T. gondii*: localização da conexina 43 e interação com o citoesqueleto 70
4.5. Infecção com o *T. gondii*: expressão da conexina 43 73

5. Discussão 76
5.1. Fatores pró-imune inflamatórios 76
5.2 Infecção com *T. gondii* X Comunicação celular 79

6.CONCLUSÃO 86
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

1) INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é o agente causador da toxoplasmose. Este protozoário possui a característica de ser intracelular obrigatório, e é capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de animais homotérmicos, incluindo assim os homens. (LÜDERA *et al*; 2001).

A soro prevalência do *T. gondii* indicou que o Brasil (56% da população geral) possui 4 vezes mais exposição ao parasita que nos Estados Unidos (13% da população geral) (DUBEY *et al* ; 2012)

O presente parasita é um patógeno com a infecção altamente bem sucedida, tendo infectado cerca de 30% da população humana global. (HIDE; 2016) Apesar da alta prevalência, a doença apresenta-se na maioria dos casos como assintomática, entretanto, em pacientes imunocomprometidos ou indivíduos com o sistema imune imaturo, a infecção pode levar a manifestações clínicas severas, como encefalites e em casos mais extremos pode levar até a morte.

As junções comunicantes também executam um papel de destaque em estudos associados às infecções parasitárias. (CAMPOS DE CARVALHO *et al*, 1998) Junções estas que são canais transmembrana que permitem a comunicação direta nos tecidos (DHEIN, 1998).

As junções comunicantes são formadas por uma família multigênica de proteínas transmembranares denominadas conexinas. Fazem parte da família destas proteínas 21 conexinas em humanos. (SOHL & WILLECKE, 2003; HERVE, 2005). As conexinas compõem diversos sistemas fisiológicos, porém estas junções não estão inteiramente caracterizadas em alguns sistemas. Dentre estes, podemos destacar o sistema imunológico, e particularmente os macrófagos que participam do processo de resposta inata (BENNET, 2003; SAEZ, 2003).

A caracterização morfológica e funcional das junções comunicantes em macrófagos, e em particular formada pela conexina 43 (proteína presente neste sistema) tem sido alvo de estudo de diversos grupos, pois possui um papel-chave na homeostase dos tecidos, na inflamação e reparação (DE MAIO *et al*, 2002; CHANSON, 2005), bem como na hematopoiese (MONTECINO-RODRIGUEZ *et al*, 2000), no entanto, seus mecanismos regulatórios ainda

merecem esclarecimentos, principalmente diante de alterações patológicas, como nos processos infecto-inflamatórios causados pelo *T. gondii*.

Vários estudos têm indicado o envolvimento de junções comunicantes na interação entre as células do sistema imunológico (ALVES *et al*, 2000; SAEZ *et al*, 2000; NIHEI *et al*, 2003; OVIEDO-ORTA & EVANS, 2004; WONG *et al*, 2004) e que, moléculas sabidamente envolvidas com a resposta imune tais como peptidoglicanos, lipopolissacarídeo (LPS), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interferon (IFN), podem influenciar a expressão de junções comunicantes, como demonstrado por Handel (2007).

De acordo com diversos achados, ainda é possível inferir que as junções comunicantes tenham outros papéis potencialmente importantes na resposta imunológica, como por exemplo, o de "alertar" células vizinhas através de moléculas de sinalização, o que pode ajudar no recrutamento de componentes associados à resposta imunológica inata e adaptativa.

O estudo em ratos após a infecção com o *T. cruzi* demonstrou que a expressão proteica da conexina 43 (Cx43) de células infectadas foi substancialmente inferior 72h após a infecção, indicando que as alterações na distribuição e funcionalidade de Cx43 estão relacionadas com a presença do parasito na célula independente de fatores solúveis envolvidos (CAMPOS DE CARVALHO *et a.l*, 1992).

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa, De carvalho *et al*. (1998) estudou as alterações em miócitos cardíacos durante a infecção *in vitro* com *Toxoplasma gondii.* Foi observado que o parasita é capaz de prejudicar o funcionamento da célula hospedeira através de alterações na comunicação célula-célula.

Com isto, indagamos como estruturas de caráter juncional em células macrofágicas associadas com o sistema imunológico se comportam na presença de fatores pró-imune inflamatórios e no processo infecto-inflamatório causado pelo *T. gondii*.

Desta forma, traçamos como **objetivo geral:** Estudar possíveis alterações da expressão das junções comunicantes formadas pela conexina 43 (Cx43) em células de linhagem macrofágica em situações de ativação inflamatória e infecção parasitária.

Para cumprir o objetivo geral deste estudo, traçamos como **objetivos específicos**:

- Avaliar o crescimento e a morfologia celular de células de linhagem macrofágica J774-G8 tratadas com fatores pró-imuno inflamatórios combinados ou infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii*;

- Analisar o perfil de comunicação celular de células de linhagem macrofágica J774-G8 tratadas com fatores pró-imuno inflamatórios combinados através de injeção de corantes;

- Estudar a expressão proteica da Cx43 em células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii* por transferência imunoeletroforética;

- Analisar a expressão e a localização da proteína Cx43 em células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii* por imunofluorescência;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TOXOPLASMOSE

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) é um patógeno intracelular obrigatório capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves, e é o agente etiológico da toxoplasmose, sendo este descoberto a mais de 100 anos (Mahmoudi *et al*; 2017). Este parasita pertencente ao Filo Apicomplexa, à Classe Sporozoea, à Sub-classe Coccidia, à Ordem Eucoccidiida, à Família Sarcocystidae e à Sub-família Toxoplasmatinae (LEVINE *et al.,* 1980).

De acordo com Souza *et al* (2010) o *Toxoplasma gondii* foi descrito em 1908 por Nicolle e Manceaux em um roedor encontrado na Tunísia, Norte da África, e por Splendore, no Brasil, em um coelho. O nome da espécie é originário do roedor Ctenodactylus gundi, do qual foi isolado; e o gênero é derivado do grego toxon (arco) e plasma (molde) devido ao seu formato encurvado e crescente.

A descoberta de um método sorológico com anticorpos específicos para o *T. gondii* por Sabin-Feldman em 1948, levou a descoberta de que este parasita tem a capacidade de infectar mundialmente qualquer animal de sangue quente o que permitiu associar as diferentes formas clínicas da doença ao *T. gondii*. (DUBEY, 2008; GUIMARAES *et al*, 2008)

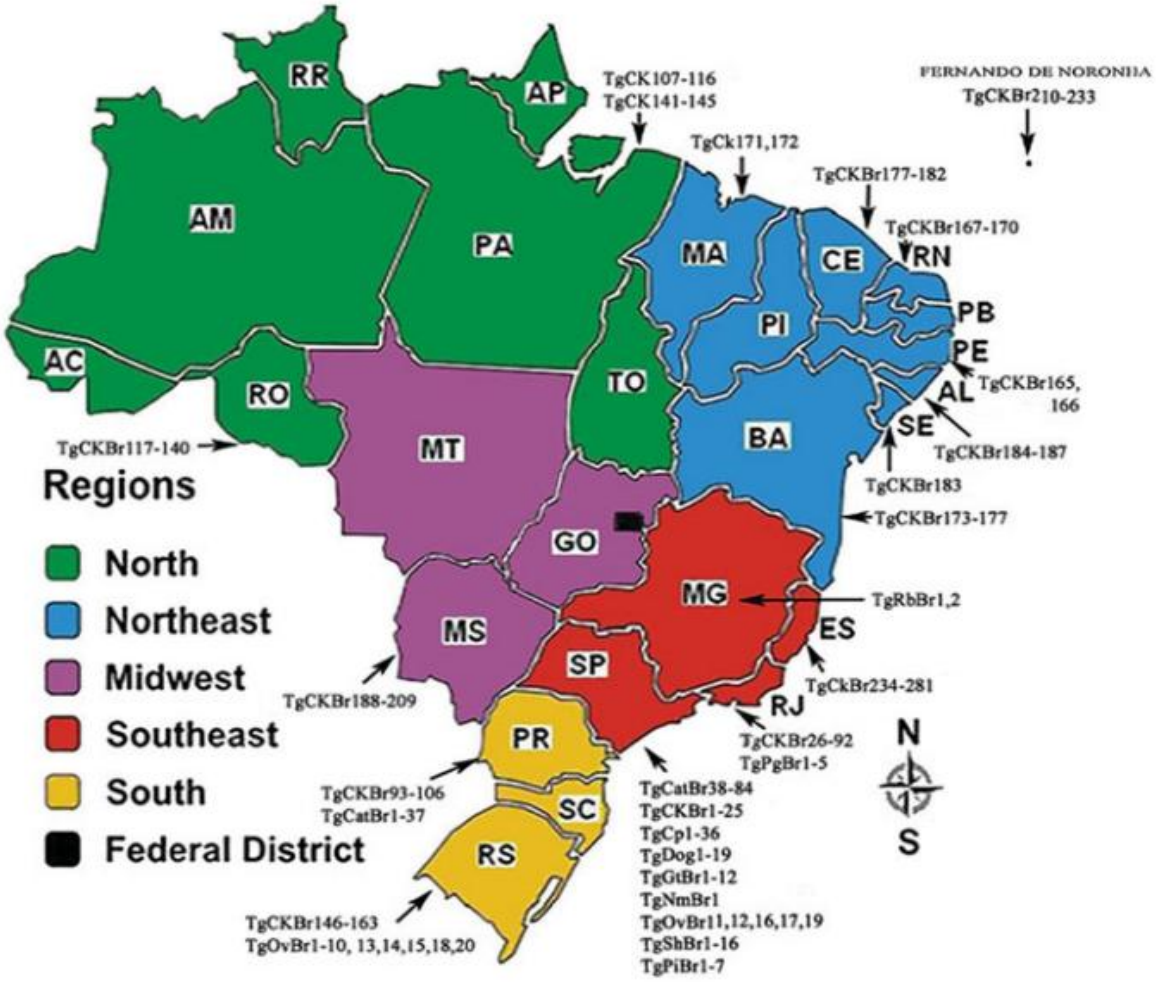
A toxoplasmose faz parte do grupo de infecções parasitárias mais comuns ao homem e a outros animais homeotérmicos, em que mais de 30 espécies de aves e 300 de mamíferos já tiveram sua infecção comprovada. (LÜDERA *et al*; 2001). Desta forma, o *T.gondii* é um dos parasitas mais estudados por sua importância médica e veterinária, bem como a sua adequação em modelos de estudo para biologia celular e estudos moleculares. (DUBEY, 2008)

Dubey *et al* (2012) demonstraram que no Brasil, 1 a cada 1000 crianças nascidas está infectada com o *T. gondii*, e anualmente 2649 crianças estão susceptíveis a nascer com toxoplasmose congênita. A maioria das crianças infectadas podem desenvolver sinais e sintomas de toxoplasmose clinicamente. Dentre as crianças infectadas congenitamente, várias morreram

logo após o nascimento, onde 35% tinham doenças neurológicas, incluindo hidrocefalia, microcefalia e retardo mental e 80% tinham lesões oculares.

De acordo com Dubey *et al.* (1998) as fontes de infecção da toxoplasmose são abundantes, e tem sido encontradas em grande número de animais domésticos e silvestres, dentre eles podem ser citados o cão, o gato, o coelho, o porco, o carneiro, o boi, o rato, o pombo e outras aves silvestres.

As fontes de *T. gondii* isoladas e genotipadas no Brasil são identificadas no mapa abaixo (Figura 1), demonstrando a quantidade de casos nos estados em que a doença foi relatada (valores apresentados em milhões de pessoas).



Figura

1- Mapa do Brasil com 5 regiões e distribuição da população humana, demonstrando fontes de *Toxoplasma gondii* isolados genotipados. Para a construção da imagem foram consultados artigos originais Sorológicos, parasitológicos, informação clínica e genética histórica detalhada sobre as infecções do T. gondii em humanos e outros animais. Abreviação dos estados — (população em milhoes, %): AC – Acre (0,7; 0,38%), AL – Alagoas (3,1; 1,64%), AM –

Amazonas (3,4; 1,83%), AP – Amapá (0,6; 0,35%), BA – Bahia (14,0; 7,35%), CE – Ceará (8,4; 443%), DF – Distrito Federal (2,5;1,35%), ES – Espírito Santo (3,5; 1,84%), GO – Goiás (6,0; 3,15%), MA – Maranhão (6,5; 3,45%) MS – Mato Grosso do Sul (2,4; 1,28%) MG – Minas Gerais (19,5; 10,27%), MT – Mato Grosso (3,0; 1,59%) PA – Pará (7,5; 3,97%), PB – Paraíba (3,7; 1,97%), PE – Pernambuco (8,7; 4,61%), PI – Piauí (3,1; 1,63%), PR – Paraná (10,4; 5,48%), RN – Rio Grande do Norte (3,2; 1,66%), RJ – Rio de Janeiro (15,9; 8,38%), RO – Rondônia (1,5; 0,82%), RR – Roraima (0,4; 0,24%), RS – Rio Grande do Sul (10,6; 5,60%), SC – Santa Catarina (6,2; 3,28%) SE – Sergipe (2,0; 1,08%) SP – São Paulo (41,2; 21,63%) TO – Tocantins (1,3; 0,73%). (Dubey *et al*; 2012)

2.1.1. CICLO DE VIDA DO *Toxoplasma gondii*

O ciclo de vida do *T. gondii* é heteróxeno, tendo como hospedeiro definitivo o felino, e neles é feita a produção dos oocistos que marca o estágio ambientalmente resistente do parasita, devido à fase sexuada de reprodução que ocorre exclusivamente nestes animais. Este é o hospedeiro mais importante, do ponto de vista epidemiológico, para a toxoplasmose humana. (HILL & DUBEY, 2016)

De acordo com Dubey *et al.* (1998) existem três estágios infecciosos no ciclo de vida do *T. gondii*: forma Esporozoíta (nos oocistos); forma Bradizoíta (nos cistos teciduais); e forma Taquizoíta (replicação assexuada).

O ciclo assexuado tem lugar nos inúmeros hospedeiros intermediários e consiste em dois estágios de vida distintos dependendo da fase da infecção: aguda ou crônica. (SOUSA *et al*., 2010)

> As fontes de infecção da toxoplasmose são abundantes, e tem sido encontrados em grande número de animais domésticos e silvestres, dentre eles podem ser citados o cão, o gato, o coelho, o porco, o carneiro, o boi, o rato, o pombo e outras aves silvestres. (DUBEY *et al.*,1998)

A forma taquizoíta está presente nas manifestações clínicas da fase aguda da toxoplasmose e possui alta taxa de proliferação, enquanto a forma bradizoíta possui proliferação lenta (SOUSA *et al*., 2010)

Espécies do gênero Felix e Lynx, mas particularmente os gatos, são os únicos hospedeiros nos quais o *T. gondii* pode realizar todo o ciclo de vida. De acordo com Elmore *et al.* (2010) a soroprevalência estimada em gatos domésticos (Felix catus), em todo o mundo, é de 30-40%. Na maioria das

vezes esse ciclo tem início com a ingestão de cistos teciduais através do carnivoríssimo. (REY, 2008)

Como foi descrito por Dubey *et al*. (1998), no ambiente externo estes oocistos esporulam, se tornando infeccioso e possuindo em seu interior esporocistos, que contém a forma infectante esporozoíta. Esta rota é a principal via de transmissão, e garante que os oocistos sejam distribuídos no meio ambiente (cursos de água, solo, alimentos para animais, consumo, etc.).

> Quando os animais que se comportam como hospedeiros intermediários de *T. gondii*, ao serem caçados ou consumidos, só contaminam a um ou poucos predadores, os hospedeiros definitivos conseguem, através da contaminação fecal do solo, multiplicar as fontes de infecção, pois o número de oocistos eliminados em uma evacuação de um gato contaminado é da ordem de 20 a 20 milhões, isto em 20 gramas de fezes. A dispersão destes material pela chuva, vento ou pela fauna coprófila pode representar alto potencial de disseminação do *T. gondii*. (Ray, 2008, p. 205)

A toxoplasmose também atinge seres humanos, em todo o mundo, sob uma variedade de climas e circunstâncias sócio-econômicas. No caso dos seres humanos, a infecção pode ocorrer pela ingestão de alimentos (solo) e água contaminados por oocistos, ingestão de cistos teciduais em carne mal cozida, manuseio de lixo de gatos e alimentação com vegetais não lavados, por transplante, transfusão de sangue, acidentes laboratoriais ou pela infecção congênita. A partir disto, o parasita irá apresentar duas formas de diferenciação de acordo com a fase da infecção, e se multiplicar assexuadamente (Figura 2). (ELMORE *et al.*, 2010; HIDE, 2016).

Pelos sintomas desenvolvidos, a infecção por oocisto independente da quantidade em seres humanos, aparentando ser mais patogênica do que por bradizoítas ou taquizoítas (DUBEY,2008)

Após a ingestão por hospedeiros intermediários, os bradizoítas ou esporozoítas se diferenciam rapidamente em taquizoítas, estes se disseminam dentro do hospedeiro e levam à fase aguda da infecção. (FERREIRA DA SILVA *et al*.,2008)

A forma taquizoíta possui como característica básica a rápida multiplicação, e a forma bradizoíta presente na fase crônica da infecção tem como característica diferencial o metabolismo lento e está presente em cistos teciduais podendo permanecer por muito tempo no tecido. A forma taquizoíta

também é a responsável pela transmissão vertical para o feto via placenta. Sob ação do sistema imunológico do hospedeiro, como método de evasão, os taquizoítas diferenciam-se em bradizoítas, que formam os cistos teciduais ou tissulares, dando início à fase crônica da infecção. (DUBEY *et al*.,1998).

Como relatado por Ferreira da silva *et al* (2008), na fase crônica da infecção, uma das estratégias de evasão do *T. gondii* frente aos mecanismos de defesa da célula hospedeira é o encistamento, no qual o parasita se diferencia de taquizoítas para bradizoítas, formando cistos teciduais.

> Na maioria das vezes esse ciclo tem início com a ingestão de cistos teciduais através do carnivorismo e após a ingestão, vários ciclos sucedem-se até a geração de micro e macro gamontes, cuja fusão resulta nos oocistos que serão eliminados com as fezes do hospedeiro e disseminados no ambiente, infectando mamíferos (inclusive o homem) e aves quando ingeridos através da água ou alimentos, e estes liberam esporozoítas no aparelho digestivo que, então, infectam células epiteliais do intestino, dando origem aos taquizoítas da fase aguda da infecção. (DUBEY & FRENQUEL, 1976)

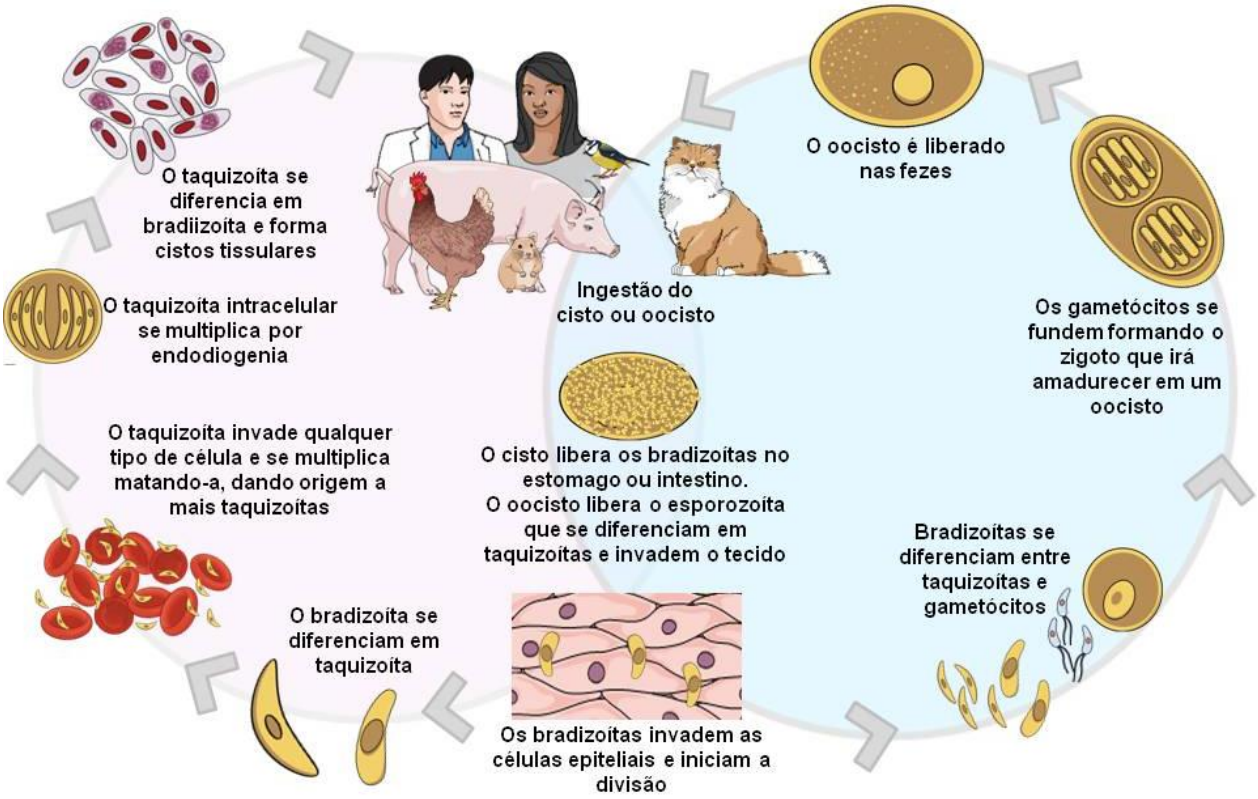


Figura 2: Organização esquemática descrevendo o ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. (Acervo LTFCM)

Quando ingerido pelo hospedeiro definitivo, a parede do cisto é destruída por enzimas proteolíticas do estômago e do intestino, libertando os bradizoítas

que, em seguida, penetram nas células intestinais e iniciam o desenvolvimento de algumas gerações de *T. gondii*.(Dubey et al, 1970).

Este período é denominado estágio Entero-epitelial, marcado pelo tempo necessário para o derramamento de oocistos após a infecção inicial, também podendo ser chamado de período pré-patente. De acordo com Dubey *et al.* (1998) o período pré-patente é de 3 a 10 dias após a ingestão de cistos nos tecidos, 18 dias após a ingestão de oocistos, e 13 dias após a ingestão de taquizoítas.

Após o inicio do desenvolvimento de numerosas gerações de *T. gondii,* cinco tipos morfologicamente diferentes se desenvolvem em células epiteliais do intestino antes gametogonia começar. Estes estágios se estendem dos tipos de A a E, como demonstrado na figura 3. (DUBEY & FRENKEL, 1976; DUBEY *et al.,* 1970, DUBEY *et al.,* 1998, HILL & DUBEY, 2002).

> Os bradizoitas são liberados de seus cistos e invadem enterócitos do intestino delgado, transformando em esquizontes. A população de parasitas que se desenvolve nos enterócitos sofre um ciclo coccidiano clássico envolvendo várias rodadas de divisão e amplificação assexuadas, seguida de diferenciação em macro e microgamontes, os estágios dimórficos do desenvolvimento sexual. Microgamontes fertilizam macrogamontes, produzindo zigotos diplóides que subsequentemente se desenvolvem em oocistos não esporulados que são excretados nas fezes do gato. A fase sexual continua dentro do oocisto à medida que se inicia a meiose, seguida por mitose para produzir esporozoitos infecciosos, dentro dos oocistos. (HEHL *et al*., 2015)

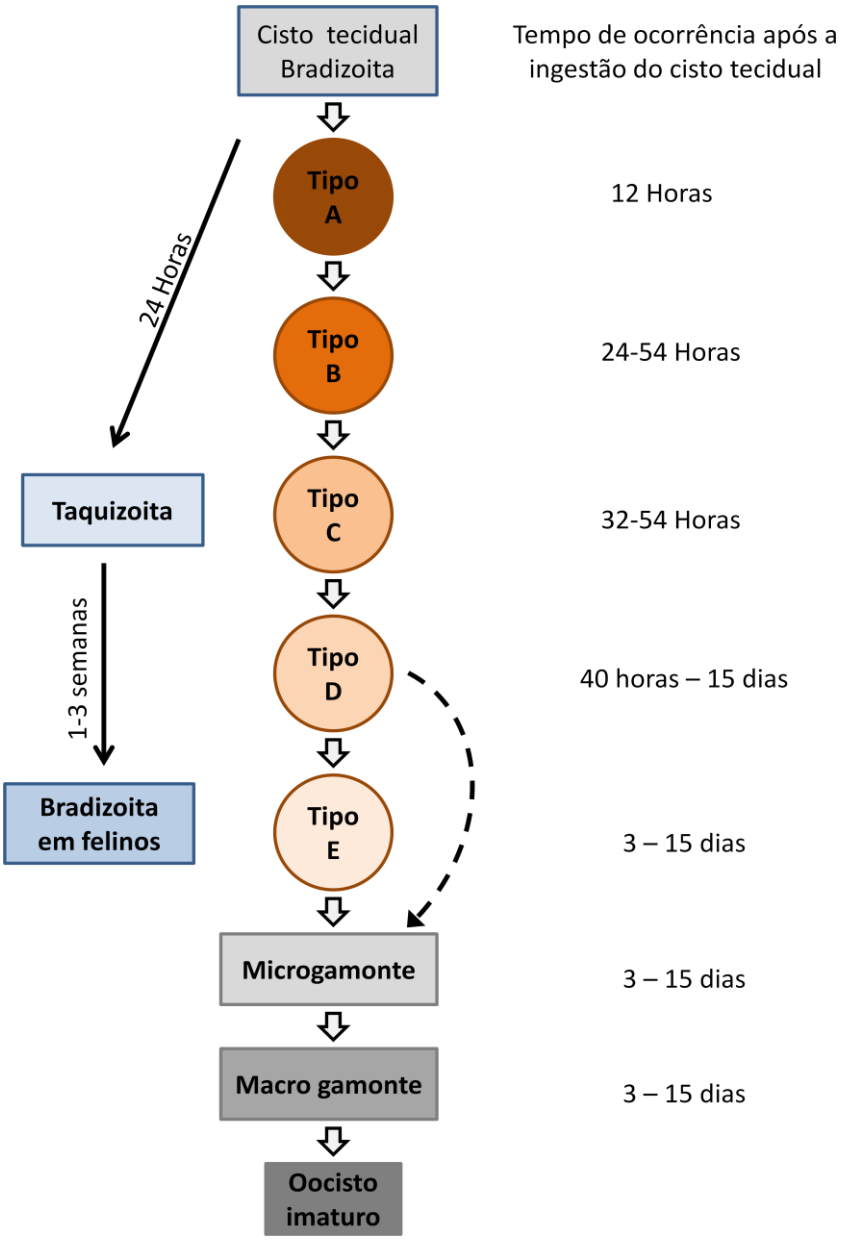


Figura 3: Esquema do ciclo sexual do *T. gondii* iniciado com a ingestão do cisto que terá a membrana rompida. No estagio de Enteroepitelia, os bradizoitas passaram pelos estágios de diferenciação A,B,C,D e E, com o decorrer do tempo, dando origem ao microgametócito que ira originar os oocitos imaturos. (Dados retirados de Dubey *et al*.,1998)

Segundo Sousa *et al.*(2010) o desenvolvimento de cistos tissulares em vários locais do corpo define a fase crônica do ciclo assexuado. Estes cistos são encontrados predominantemente no sistema nervoso central e nos tecidos musculares esquelético e cardíaco, onde podem permanecer pelo resto da vida do hospedeiro sem causar resposta inflamatória. Os cistos tissulares são a fase terminal do ciclo assexuado nos hospedeiros intermediários e uma fonte importante de contaminação do homem, quando ingeridos na carne crua ou

mal cozida de animais contaminados, uma vez que as formas bradizoítas são resistentes às enzimas presentes no suco gástrico. (DUBEY *et al*., 1998)

Após isto os bradizoítas se diferenciam em taquizoítas, tornando-se intracelulares, pois são capazes de invadir qualquer tipo de célula. Muitos tipos de células circulantes, tais como macrófagos, estão envolvidos na locomoção do parasita no corpo do animal ou homem. Eventualmente, o sistema imunológico do hospedeiro é capaz de gerar uma resposta ao parasita, e os taquizoítas se transformam em bradizoítas. Neste ponto, os bradizoítas se desenvolvem em um cisto de tecido, que pode persistir durante o tempo de vida do hospedeiro. (Hide, 2016)

2.1.2. ASPECTOS CELULARES BÁSICOS

O filo Apicomplexa é caracterizado pela presença do complexo apical, composto de organelas secretórias especializadas, como róptrias e micronemas, e de elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e o conóide, este último apenas nos coccídeos, subclasse que inclui *T. gondii*. (SOUZA *et al*.,2010)

Rey (2008) descreveu que a glicose é a principal fonte de energia para o *T. gondii*. Ela é oxidada segundo o esquema de Embden-Meyerhof da glicose fosforilativa.

> O açúcar é desdobrado em ácido lático, ácido ácetico e outros produtos. O oxigênio consumido produz CO_2, tendo um sistema citocromo que oxida o NADH. A respiração é cianeto-sensível. Em toxoplasmas livres e intracelulares, foram encontradas reservas que parecem ser de glicogênio, sob a forma de pequenos grânulos, mais volumosos nos parasitos contidos em cistos. (REY, 2008)

Toxoplasma gondii apresenta três linhagens diferentes, designadas cepas do tipo I, II e III, classificadas de acordo com a virulência e a ocorrência epidemiológica.

O genótipo I é menos encontrado, porem de maior patogenicidade. O genótipo II é a mais frequente como causa de doenças caracterizadas pela baixa virulência e alta capacidade de formar cistos, esta relacionada com lesões oculares ou com o retorno a fase aguda da toxoplasmose na

imunodeficiência humana adquirida. O genótipo III ocorre principalmente em animais. (SIBLEY *et al.,* 2011)

Há três tipos de estágios infecciosos do *T.gondii*: taquizoítas (“tachos” = rápido em Grego), em grupos de clones; bradizoítas (“brady” = devagar em Grego), em cistos teciduais, e; esporozoítas, em oocistos (MERCIER *et al*., 2002).

2.1.2.1. O TAQUIZOÍTA

As formas do parasita em diferentes estágios no ciclo de vida apresentam suas características específicas, como demonstradas na figura 3 e 5. O taquizoíta de *T. gondii* é uma célula polarizada, de forma alongada, apresentando a região anterior afilada e a região posterior arredondada. Estes possuem aproximadamente 5µm de comprimento e 2µm de largura. (BOOTHROYD & BLACK, 2000)

> Na região anterior ou apical estão localizados os anéis polares, o conóide, as róptrias e os micronemas, estruturas que formam o complexo apical. O núcleo celular situa-se na região mediana e acima deste dispõem-se o complexo de Golgi e o apicoplasto. Compondo o envoltório nuclear e ramificando-se pelo citossol, estão presentes elementos do retículo endoplasmático. A mitocôndria é única e ramificada. Os grânulos densos, acidocalcissomas e grânulos de amilopectina estão presentes em número e localização variáveis. O conjunto é envolvido pelo Complexo interno de membrana e, abaixo desta, partindo do anel polar posterior, irradiam-se os microtúbulos subpeliculares que percorrem o corpo celular no eixo longitudinal até cerca de dois terços de sua extensão. (SOUZA *et al*., 2010)

Dubey *et al.* (1998) colocou que as funções do conóide, roptrias, microporos, e micronemas não são totalmente conhecidas, mas provavelmente estão associados com a penetração na célula hospedeira e criação de um ambiente adequado para parasita intracelular crescer e se desenvolver.

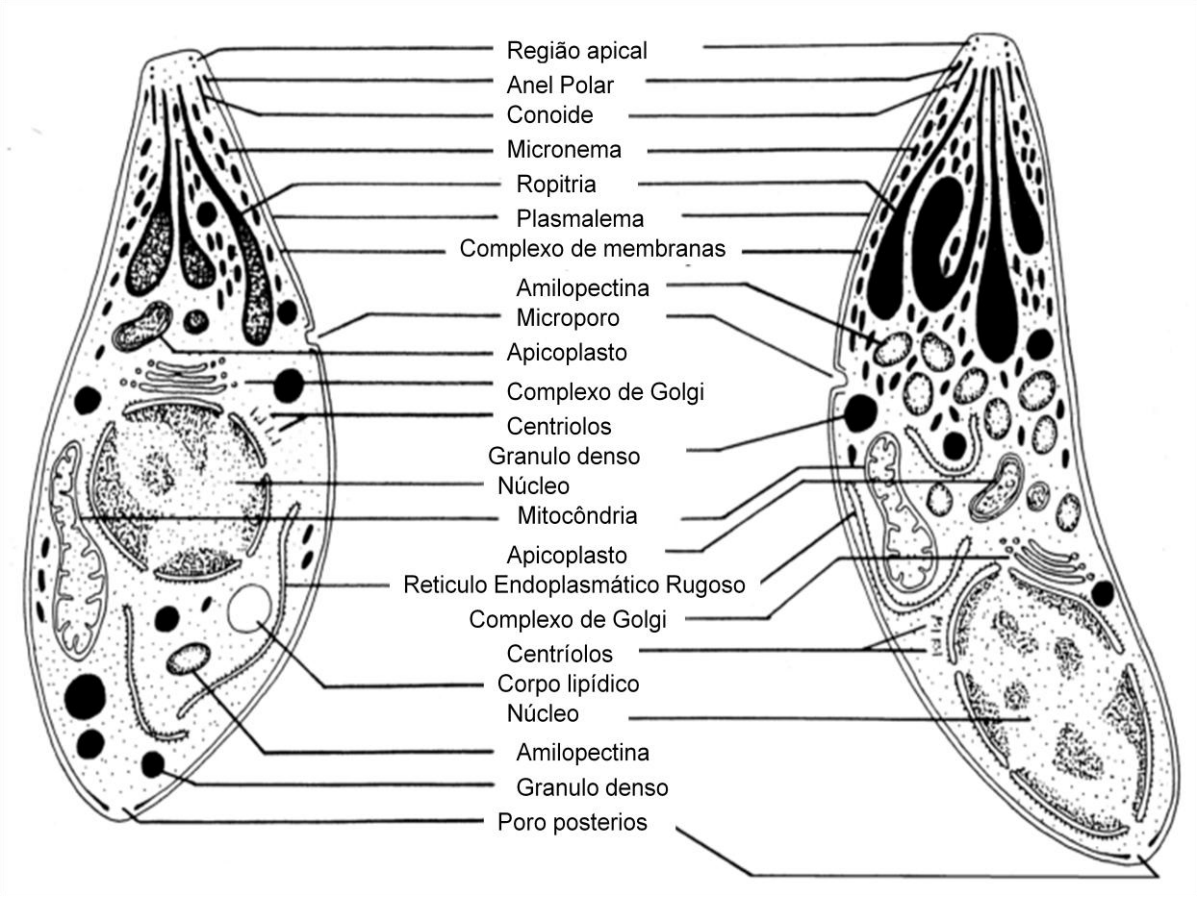


Figura 4: Desenhos esquemáticos de um taquizoíto (à esquerda) e um bradizoíto (à direita) de T. gondii. (DUBEY *et al.,*1998)

O taquizoíta consegue se deslocar por deslizamento, flexão ondulante e com movimentos rotatórios, não possuindo meios visíveis de locomoção como cílios, flagelos ou pseudópodes.(DUBEY *et al*., 1998) O *T. gondii* se locomove através da associação da película com os elementos do citoesqueleto. A película, estrutura trimembranar que envolve o taquizoíta, é formada pela membrana plasmática e pelo complexo membranar interno. Este é formado pela associação íntima de longas cisternas achatadas, interrompidas em vários pontos de sua superfície. (SOUZA *et al*., 2010)

O parasita na forma taquizoíta entra nas células hospedeiras por penetração ativa através da membrana da célula hospedeira ou por fagocitose. (DUBEY *et al.,* 1998). No processo de entrada, o parasita exclui a maioria das proteínas da superfície das células hospedeiras, que através de interações com o citoesqueleto de base, e através de diferenças na ancoragem na membrana plasmática que influenciam a fluidez da membrana. Esse processo é conhecido por junção móvel (SIMBLEY, 2011).

Depois de penetrar na célula hospedeira, o taquizoíto torna-se oval e está rodeado pelo vacúolo parasitóforo. (DUBEY *et al.,* 1998) Esse vacúolo tem características não fusogênicas, evitando a fusão com os elementos das vias sendo e exocíticas da célula hospedeira e escapando, assim, de uma fusão com os lisossomas. As róptrias, no momento da adesão e após a invasão, secretam seus conteúdos na célula hospedeira através de vesículas que irão se fundir com a membrana do vacúolo. (SOUZA *et al.,* 2010)

Dubey *et al.* (1998) relatou que o taquizoíta multiplica-se assexuadamente no interior da célula hospedeira por endodiogenias repetidas, uma forma especializada de reprodução em que são formadas duas células filhas do parasita original. (Figura 5)

> O início da endodiogenia é marcado pelo alongamento do complexo de Golgi e do apicoplasto, seguida da divisão do centrossomo na porção posterior ao núcleo e do complexo de Golgi. Em seguida, ocorre o aparecimento de dois novos complexos apicais rudimentares, consistindo de conóide, anéis apicais e anel polar posterior, que irão nuclear os microtúbulos subpeliculares e o complexo interno de membrana. Essas estruturas membranares começam a definir as células filhas dentro do citoplasma da célula mãe. (SOUSA *et al.,*2010)

A divisão nuclear ocorre por uma endomitose fechada, ou seja, o envelope nuclear permanece intacto, desta forma o núcleo adota a forma de ferradura, com as pontas crescendo em direção aos conoides. Na medida em que vão se formando dois núcleos filhos independentes as estruturas membranosas crescem para trás, envolvendo cada um dos núcleos e englobando outras organelas celulares. (BOOTHROYD & BLACK, 2000)

> A mitocôndria é a última organela a ser incorporada durante esse processo.(...) Cada célula filha continua sua maturação até que o citoplasma e todo o seu conteúdo estejam divididos entre as duas proles. (SOUSA *et al.,*2010)

A célula mãe então se degenera e deixa livre os dois taquizoítas, que por um tempo ainda se manterão unidos pela extremidade posterior. (BOOTHROYD & BLACK, 2000)

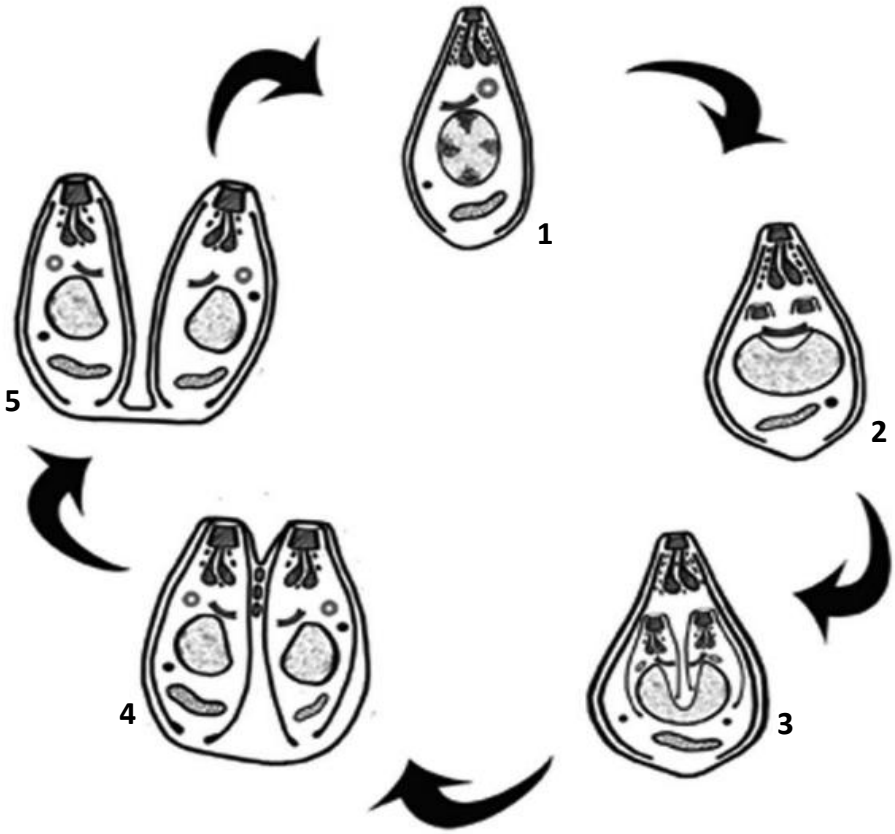


Figura 5: Diagrama simplificado do processo de divisão do *Toxoplasma gondii* por endodiogenia. No início da divisão (1), dois complexos apicais começam a se desenvolver no meio da célula lembrando um conóide rudimentar e um centro organizador de microtúbulos. o núcleo assume formato de ferradura (2). À medida que o complexo interno se estende a partir destas estruturas, o núcleo, apicoplasto e a mitocôndria dividem-se entre as duas células filhas em formação (3). Ao término, as células filhas brotam e são envoltas pela membrana plasmática da célula mãe até a cisão completa(4). As células podem permanecer unidas por um corpo residual (5) ou separar-se dando início ao novo ciclo. Imagem modificada de Sousa *et al*., (2010).

Os parasitas resultantes das divisões celulares organizam-se na forma de rosetas dentro do vacúolo parasitóforo e, após sucessivas multiplicações, atravessam ativamente a membrana do vacúolo e da célula hospedeira, que acaba por romper-se, liberando novos taquizoítas capazes de infectar outras células. (SOUSA *et al.,*2010)

Eles se replicam dentro de uma célula com um tempo de geração de 6 a 8 horas (in vitro), até que saem da célula para infectar células vizinhas, com geralmente 64 a 128 parasitas intracelulares. (BOOTHROYD & BLACK, 2000)

2.1.2.2. O BRADIZOÍTA

No animal infectado, os taquizoítas se diferenciam em bradizoítas e formam cistos teciduais que aparecem pela primeira vez de 7 a 10 dias após a infecção, marcando o estágio crônico do ciclo assexuado. (BOOTHROYD & BLACK, 2000)

Os bradizoítas se diferem estruturalmente de taquizoítas. Eles têm um núcleo situado em direção à extremidade posterior, enquanto o núcleo dos taquizoítas é mais central. Eles são mais delgados do que os taquizoítas e são menos suscetíveis à destruição por enzimas proteolíticas. (Figura 4) (DUBEY *et al.,* 1998)

O termo bradizoita (bradi = lento em grego) foi criado por Frenkel para descrever o organismo multiplicando-se lentamente dentro de um cisto de tecido, mas os bradizoítas também são denominados cistozoítos. Os cistos teciduais crescem no meio intracelular com os bradizoítas dividindo-se por endodiogenia. Os cistos de tecido variam em tamanho; cistos de tecido novo podem ser pequenos com 5µm de diâmetro e contendo apenas dois bradizoítas, enquanto as mais velhas podem conter centenas de organismos. (Dubey & Frenkel, 1976)

Apesar de cistos teciduais se desenvolverem em órgãos viscerais, incluindo os pulmões, o fígado e os rins, os tecidos que são mais prevalentes são os neurais e musculares, incluindo o cérebro, olhos e músculos (esqueléticos e cardíacos). (BOOTHROYD & BLACK, 2000)

Cistos teciduais intactos provavelmente não causam nenhum dano e podem persistir durante a vida do hospedeiro, sem causar uma resposta inflamatória do hospedeiro. Estes, geralmente são esferoidais e raramente atingem um diâmetro igual a 70 µm, enquanto os cistos intramusculares são alongados e podem ter 100 µm de comprimento. (DUBEY *et al.,* 1998)

2.1.2.3. O ESPOROZOÍTO

Apresentado por Sibley (2011), a esporulação ocorre no ambiente dentro de um período de 1 a 5 dias após a sua excreção, dependendo da temperatura e arejamento local. Morfologicamente, os oocistos esporulados são esferas que

possuem de 10 a 12 µm de diâmetro, e sob microscopia de luz, a parede do oocisto consiste em duas camadas incolores.

A ultraestrutura da parede do oocisto esporulado consiste em três camadas: uma camada densa exterior de eletro densa; uma camada de meio elétron lúcida; e uma camada interna de elétrons moderadamente densa. A camada intermédia é composta de dois restos de membranas que, foram estabelecidas entre as camadas interior e exterior durante a formação da parede do oocisto. (DUBEY *et al.,*1970)

Os oocistos esporulados são subesféricos a elipsoidais e possuem um diâmetro que varia de 11 à 13 micrometros. Cada oocisto contém dois esporocistos elipsoidais que medem de 6 a 8 µm. Nesta organização, cada esporocisto contém quatro esporozoítas. (SIBLEY, 2011)

> Na formação do esporozoíto o citoplasma do oocisto esporulado tem um grande núcleo com nucleoplasma e o zigoto é limitado por uma unidade de membrana com alguns microporos. O núcleo divide duas vezes, dando origem a quatro núcleos, que estão situados na periferia do zigoto, nesta fase, uma segunda membrana limitante é formada. Após isto, o citoplasma divide em dois esporoblastos esféricos e são formados dois núcleos, os esporoblastos são alongado e os esporocistos são formados. As duas membranas exteriores dos esporoblastos tornam a camada exterior da parede do esporocisto. Em seguida o esporocisto desenvolve quatro placas arqueadas para formar a camada mais interna do esporocisto. As placas estão interligadas por quatro suturas lipídicas e com uma depressão na superfície da parede de esporocisto no ponto de união. A formação do esporozoítos começa quando as duas placas densas aparece em ambas as extremidades do esporocisto. Um corpo residual de destaque é deixado após a formação dos esporozoítos. (FERGUSON *et al*, 1978) (Figura 6)

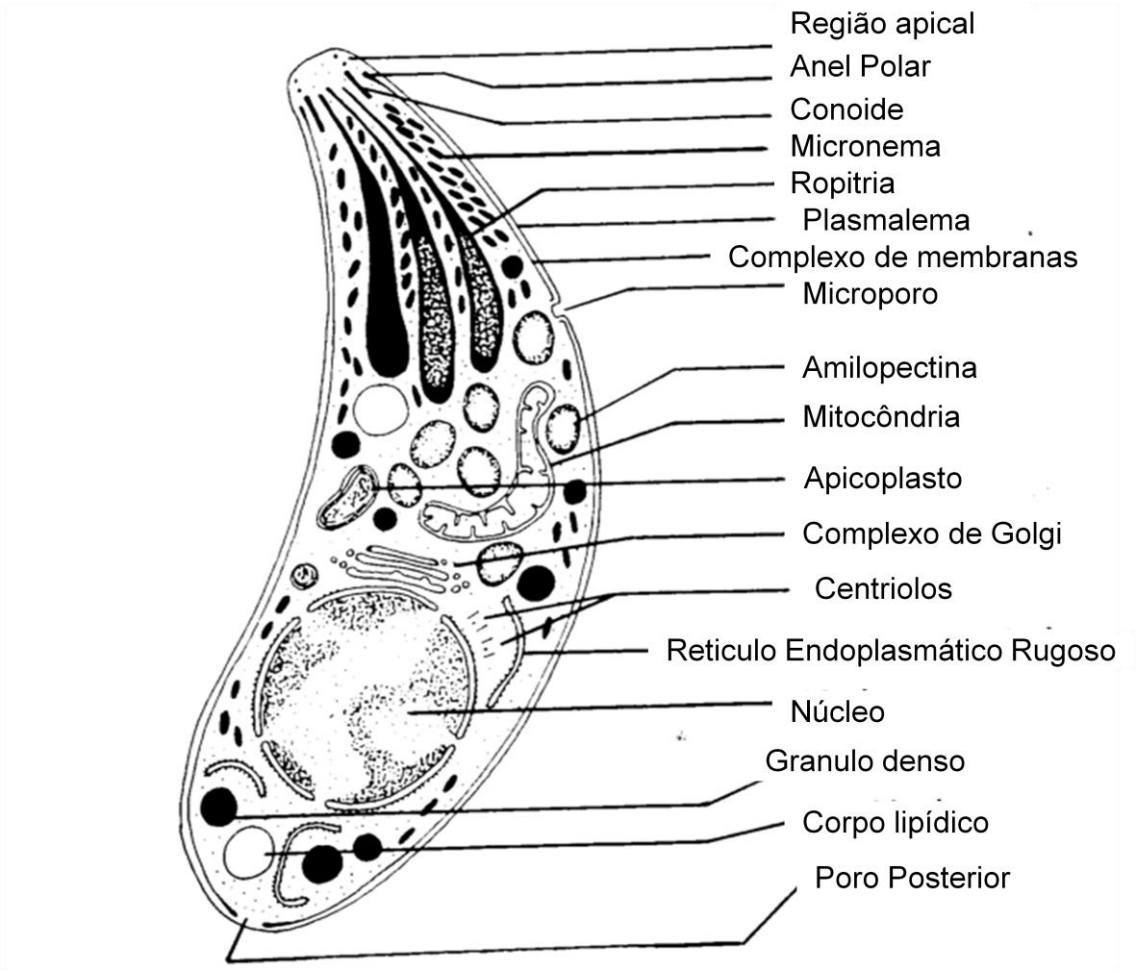


Figura 6: Desenho Esquemático do esporozoíto. (DUBEY *et al.,* 1998)

2.1.3. ASPECTOS CLÍNICOS DA TOXOPLASMOSE

O quadro clínico da doença no homem varia consideravelmente, sobretudo em função da idade em que se dê a contaminação. (DUBEY, 2008) Na toxoplasmose congênita, as mulheres com infecção crônica pelo *T. gondii* não contaminam seus filhos, durante o desenvolvimento intrauterino, no entanto, as mulheres que contraem a doença durante o período de gestação estão sujeitas a riscos de alta gravidade. (FERREIRA-DA-SILVA *et al.,* 2008)

Entretanto, ocorrem casos de toxoplasmose congênita em recém-nascidos de mães imunizadas contra toxoplasmose antes da concepção, em que provavelmente a reinfecção ocorreu pela ingestão de carne contaminada (ELBEZ-RUBENSTEIN, 2009).

Em mulheres que contraem a doença durante a gravidez, o parasita atravessa a placenta e infecta o feto, justamente enquanto o sistema imunológico do hospedeiro é modificado para impedir a rejeição do feto,

proporcionando uma oportunidade para o parasita atravessar a placenta (Hide; 2016). Com a ação do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítas diferenciam-se em bradizoítas, de multiplicação lenta e metabolismo baixo, que formam os cistos teciduais ou tissulares que causa diversas deficiências no feto (TIBAYRENE *et al*., 1991).

De acordo com Rey, (2008) geralmente os casos de toxoplasmose congênita apresentam-se com decurso sub-agudo ou crônico, em que os parasitos invadem todos os órgãos, mas prevalecendo as lesões do sistema nervoso e da retina. As síndromes mais características quando o feto sobrevive é a Corioretinite (90%), as calcificações cerebrais (69%), as perturbações neurológicas (60%) e o hidrocéfalo interno ou microcefalia (50%).

Na toxoplasmose pós-natal, Souza *et al.* (2010) expôs que pode haver a adenopatia, afetando os gânglios cervicais e pode em alguns casos, simular o quadro de linfoma. Uma corioretinite pode ser a única consequência ou a única manifestação da toxoplasmose. Mas ocorrem também formas graves com febre, mal-estar, dores musculares e articulares, no início da infecção. Estes casos são acompanhados de prostração, hepatite, esplenite, miocardite e por vezes, meningite e encefalomielite. Dependendo da gravidade, o óbito sobrevém em uma semana.

A toxoplasmose em pacientes imunodeficientes é extremamente grave, apresentando na maioria dos casos encefalite aguda, que mata em poucos dias, mas em outras vezes a evolução pode ser prolongada, sendo possível observar a toxoplasmose extra cerebral (ocular, pulmonar ou cardíaca). (BOOTHROYD & BLACK, 2000)

O estudo de Porter & Sander (1992) relatou que a maioria dos pacientes apresenta febre e dor de cabeça. A alteração das funções cerebrais manifesta-se por confusão, letargia, alucinações ou psicose, perda de memória ou do conhecimento e coma.

De acordo com Ray (2008) o diagnostico consiste na busca do parasita em exsudatos e no líquor, em cortes de tecidos ou placenta, ou em impressões de órgãos. Também é realizado o diagnóstico imunológico, o PCR (reação em cadeia de polimerase) e recentemente tem sido utilizada a semeadura em cultura de tecidos.

O tratamento da toxoplasmose faz uso de quimioterápicos que Dubey (2008) afirmou ter o caráter supressivo, agindo sobre os taquizoítas, mas não afetando a fase crônica, pois os bradizoítas estão protegidos pelas formações císticas. Os únicos medicamentos que já demonstraram ser eficazes efetivamente contra a toxoplasmose aguda de pacientes adultos são combinações de sulfonamidas com pirimetamina. Acresce que as drogas efetivas são poucas e bastante tóxicas, nas doses requeridas para o tratamento (BOOTHROYD & BLACK, 2000; DUBEY, 2008).

A prevenção se da pela diminuição do risco de exposição, e isto inclui usar luvas durante a manipulação do solo, ao descartar as fezes de gato e lavar as mãos após essas atividades. Também é importante: (1) não ingerir carne mal cozida, pois podem ter cistos de tecido viáveis; (2) lavar facas de cozinha depois de terem sido usados para cortar carne crua, frutas e legumes; (3) congelamento de carne a 12 ° C durante 24 horas e/ou cozimento de carne até atingir uma temperatura interna de 66°C; (4) bem como lavagem de mãos frequente. A contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* é uma preocupação de saúde pública, devido ao escoamento das fezes felinas contendo oocistos de *T. gondii* entrarem no ecossistema aquático. (JONES *et al.,* 2009; ELMORE *et al*., 2010)

2.2. JUNÇÕES COMUNICANTES

O estudo da comunicação intercelular, ao longo dos anos, é alvo de estudos e descobertas importantes para um melhor entendimento tanto de funções orgânicas indispensáveis a sobrevivência, quanto para compreensão de doenças que possam vir a alterar a homeostase em que o organismo se encontra.

No final da década de 50 Furshpan & Potter (1959) apresentaram os primeiros indícios de comunicação intercelular com os dados que evidenciaram o acoplamento elétrico em neurônios de lagostim.

Outros trabalhos demonstraram o acoplamento elétrico anteriormente descrito em outros tipos celulares, porém sem conseguir afirmar que estrutura seria responsável por tais fenômenos. No final dos anos 60, experimentos de microscopia eletrônica de transmissão em amostras tratadas previamente com

nitrato de lantânio permitiram a visualização de estruturas heptalaminares, apresentando um padrão hexagonal de subunidades de 7 a 8nm de diâmetro, e com espaços de aproximadamente 2nm entre as membranas das células adjacentes (REVEL & KARNOVSKY, 1967).

Utilizando técnicas de difração de raios X, a estrutura juncional foi melhor elucidada. As observações demonstraram que o canal era formado por seis monômeros que formam um poro de diâmetro de 1.5nm, permitindo que através do alinhamento dos hemicanais na membrana se tenha a comunicação entre as membranas das células adjacentes, como proposto na Figura 6 (MAKOVSKI *et al.,* 1977; Laird, 2006; Goodenough & Paul, 2009; KOVAL *et al.,* 2015).

Os hemicanais alinhados adquirem um formato tubular atingindo um comprimento total de 100 – 150 Aº, estando nas membranas das células a uma distância de aproximadamente 20 Aº (DHEIN, 1998). Após os achados morfológicos, a correlação das junções com o acoplamento elétrico se tornou mais evidente (GILULA *et al.,* 1972). Além de representar uma via de baixa resistência de propagação de impulsos elétricos em mamíferos, o canal juncional permite o trafego de moléculas com peso de ate 1kDa (FLAGG *et al.,* 1979; KOVAL *et al.,* 2015; KIM *et al., 2016*), possibilitando o intercambio de íons e varias substancias orgânicas extremamente importantes, como aminoácidos, nucleotídeos, AMPc e Inositol (SAEZ *&* SPRAY, 1991; DHEIN, 1998; HERVE, 2004).

> Diante das varias formas de comunicação intercelular merece destaque a que ocorre através da Junção Comunicante ou *"Gap Junction"*, caracterizada por canais transmembranares que permitem a comunicação direta nos tecidos (DHEIN, 1998).

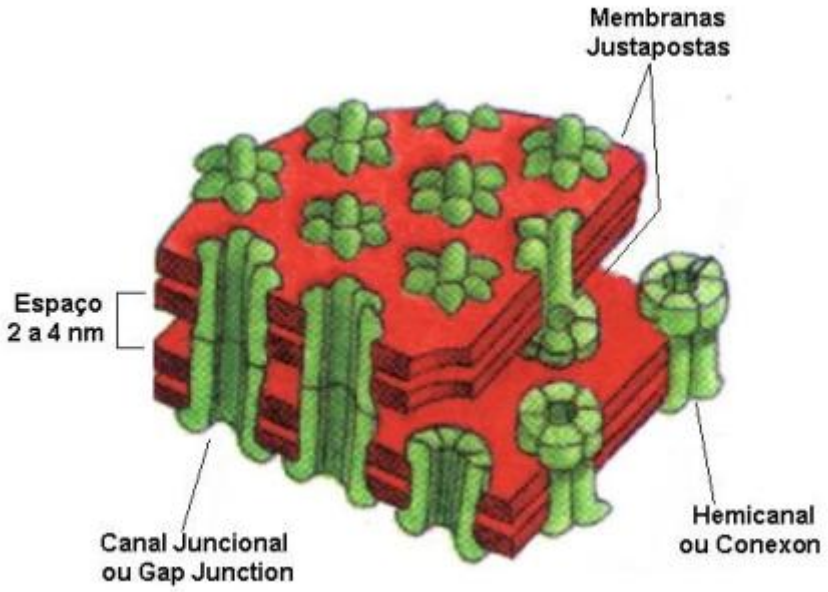


Figura 7: Esquema da organização dos canais juncionais na membrana plasmática (Makovski *et al.*, 1977 adaptado por Alberts *et al.*, 1994).

As junções comunicantes são formadas por uma família multigênica de proteínas transmembranares denominadas conexinas. Tais proteínas podem ser divididas em nove domínios estruturais: quatro domínios transmembrana apresentando uma estrutura em α-hélice (TM1, TM2, TM3 e TM4); uma porção C-terminal; uma porção N-terminal; duas alças extracelulares (E1 e E2); uma alça intracelular ou citoplasmática entre as regiões transmembrana 2 e 3, caracterizada por representar a região de menor similaridade e menor conservação entre as conexinas (AC) (Figura 8) (KUMAR & GILULA, 1996; HERVE *et al.,* 2004).

Os domínios transmembranares e as alças extracelulares são as regiões que apresentam maior conservação filogenética entre os integrantes da família das conexinas, enquanto que o domínio carboxi-terminal e os demais apresentam pouca conservação filogenética (BENNETT *et al.,* 1991; DHEIN, 1998). Por ser a região mais anfipática, supõe-se que o domínio transmembrana 3 constitua a região central do canal juncional, aquele que forma as paredes do canal.

As pesquisas sobre a multigenicidade da família das conexinas tiveram início com a comparação de sequências de aminoácidos de diferentes proteínas (GROS *et al.,* 1983). Um grande impulso aos estudos foi dado com a

clonagem das conexinas, sendo a conexina 32 a primeira delas a ser clonada (PAUL, 1986).

Para diferenciar os componentes da família das conexinas, foi utilizado como um dos parâmetros os pesos moleculares, em kDa, advindos das sequencias de cDNA, onde o total do numero de conexinas esta dividido em dois ramos filogenéticos: Grupo I, formado por conexinas com um peso molecular menor que 32 kDa; Grupo II, constituído por conexinas com peso molecular igual ou maior que 32 kDa (BENNETT *et al.,* 1995; DHEIN, 1998; SOSINSKY & NICHOLSON, 2005).

As conexinas também podem ser classificadas nos subgrupos α e β de acordo com a similaridade entre determinadas regiões da sequencia proteica primaria da conexina (GIMLICH *et al.,* 1990; WILLECKE *et al.,* 2002; SEGRETAIN & FALK, 2004).

Fazem parte da família destas proteínas 21 conexinas em humanos e 20 conexinas em roedores (Tabela 1) (SOHL & WILLECKE, 2003; HERVE, 2005).

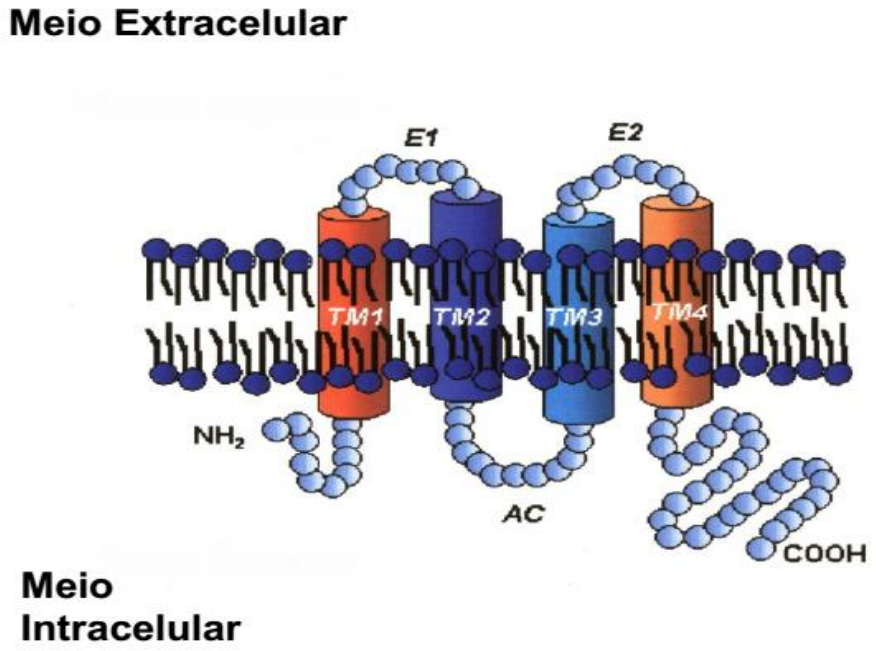


Figura 8: Organização topológica da proteína juncional (conexina) na membrana plasmática (Kumar & Gilula, 1996).

Homem		Camundongo	
Conexina	Peso Molecular (kDa)	Conexina	Peso Molecular (kDa)
-	-	mCx23	23,013
hCx25	25,892	-	-
hCx26	26,200	mCx26	26,411
hCx30	30,096	mCx29	28,981
hCx30.2	30,213	mCx30	30,366
hCx30.3	30,419	mCx30.2	30,219
hCx31	30,817	mCx30.3	30,388
hCx31.1	31,088	mCx31	30,901
hCx31.3	31,347	-	-
hCx31.9	31,933	mCx31.1	31,194
hCx32	32,024	mCx32	32,003
-	-	mCx33	32,860
hCx36	36,248	mCx36	36,085
hCx37	37,413	mCx37	37,696
hCx40	40,140	mCx39	39,996
hCx40.1	40,438	mCx40	40,413
hCx43	43,008	mCx43	43,003
hCx45	45,482	mCx45	45,665
hCx46	46,655	mCx46	46,302
hCx47	47,427	mCx47	46,603
hCx50	48,173	mCx50	49,597
hCx59	58,842	-	-
hCx62	61,871	mCx57	57,114

Tabela 1. Família Multigênica das Conexinas (Sohl & Willecke, 2003)

As conexinas estão organizadas na membrana plasmática sob a forma de hexâmeros, constituindo o hemicanal juncional, comumente chamado de conexon. Cada conexon e constituído por seis proteínas, arranjadas em forma hexagonal, e possuindo uma organização topológica de membrana característica e semelhante para todas as conexinas (MAKOVSKI *et al.,* 1977; DERMIETZEL & SPRAY, 1993; KUMAR & GILULA, 1996; WHITE *et al.,* 1999; UNGER *et al.,* 1999; SEGRETAIN & FALK, 2004; KIM *et al.,*2016; LILY *at al.,* 2016). Quando interagindo de forma não covalente com o conexon da célula adjacente, forma-se um canal juncional completo (BENNETT *et al.,* 1991).

Doze conexinas interagem para formar um canal juncional completo, seis conexinas na membrana plasmática de uma célula se encaixar com hexâmeros compatíveis em uma célula adjacente. (KOVAL *et al.,* 2014) Ao se formarem, os conexons podem ser constituídos de conexinas iguais, por exemplo, todas formadas pela conexina 43 (Cx43), sendo chamados de hemicanais

homoméricos, ou caso sejam formados por conexinas diferentes são chamados de hemicanais heteroméricos (WANG & PERACCHIA, 1998; LILY *at al.,* 2016).

Em relação ao canal juncional completo, podemos classifica-lo das seguintes formas: (1) homomérico – homotípico, onde o canal e formado por dois hemicanais idênticos e formados pela mesma conexina; (2) homomérico–heterotípico, o canal é formado por dois conexons diferentes, sendo que os conexons em si são formados pela mesma conexina, por exemplo um conexon e formado pela conexina 43 e o outro e constituído pela conexina 37; (3) heteromérico – homotípico, onde o canal e formado por dois conexons iguais, sendo que estes são formados por conexinas diferentes, estando as conexinas de um conexon alinhadas com conexinas de mesmo tipo no outro conexon, por exemplo Cx43 com Cx43, Cx37 com Cx37; (4) heteromérico – heterotípico ou biheteromérico, onde o canal e formado por dois conexons diferentes, e estes também são formados por conexinas diferentes, estando as conexinas de um conexon alinhadas com conexinas diferentes no outro conexon (Figura 9) (KUMAR & GILULA, 1996); (5) monoheteromérico, onde apenas um dos conexons e heteromérico (Figura 10) (SOSINSKY *IN* PERACCHIA, 2000; KOVAL *et al.,* 2015). A figura 11 fornece um guia razoável para a compatibilidade heteromérica entre conexinas (KOVAL *et al.,* 2014).

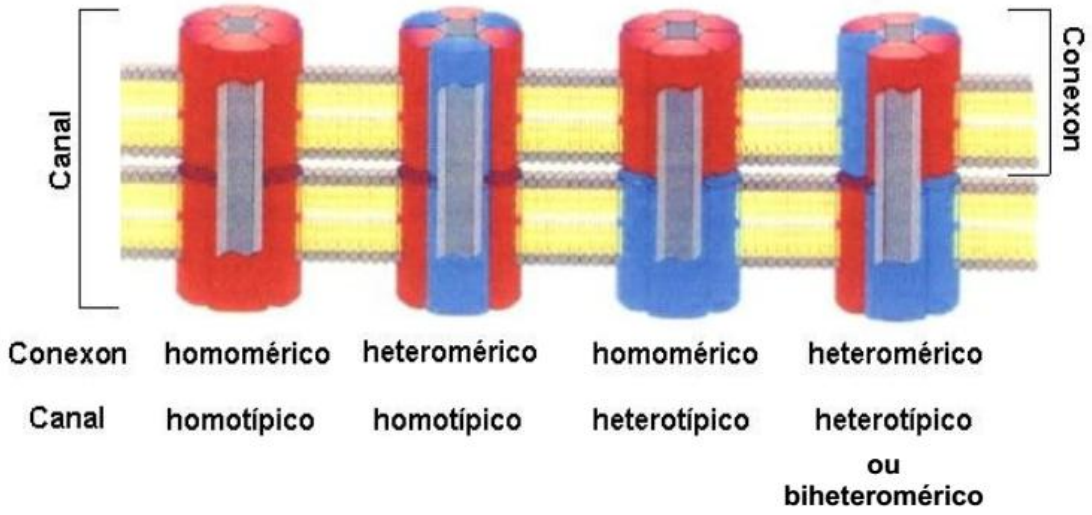
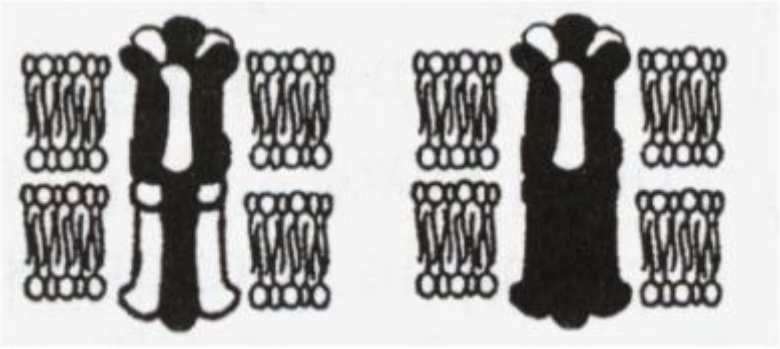


Figura 9: Tipos de conexons e canais juncionais formados por associação de conexinas iguais ou diferentes (Kumar & Gilula, 1996).



Canal Monoheteromérico

Figura 10. Tipo de canal juncional formado pela associação das conexinas em esquema proposto por Sosinsky *in* Peracchia, 2000.

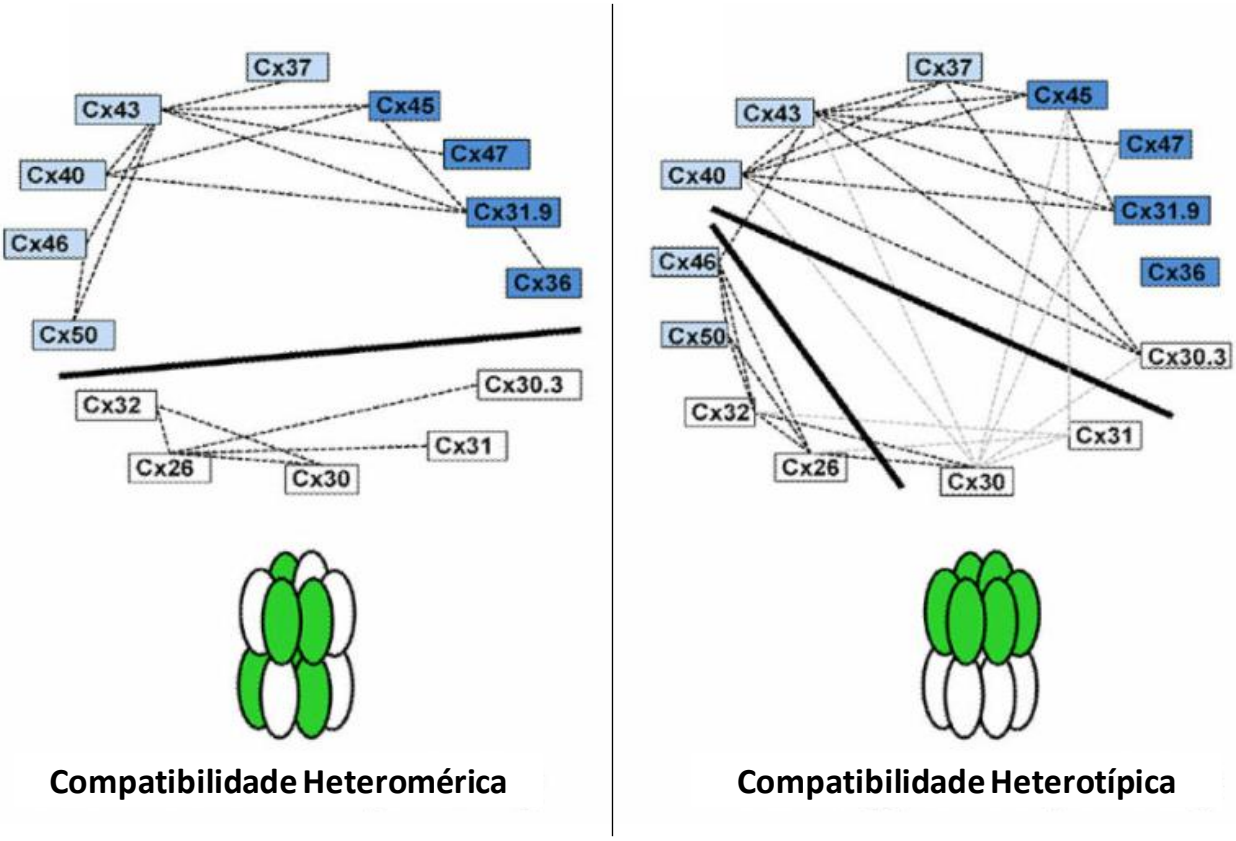


Figura 11. Compatibilidade heterotérica e heterotípica. Interacções heteroméricas indicadas pelo diagrama aponta onde há conexinas conhecidas por formarem canais heteroméricos, e estes estão ligadas por linhas tracejadas. A linha divisória sólida separa as conexinas para indicar uma falta de compatibilidade heteromérica. Interações heterotípicas indicadas pelo diagrama onde conexinas conhecidas por formarem canais heteroméricos são conectados por linhas tracejadas. Existem dados conflitantes sobre os canais heterotípicos Cx30 e Cx31. A linha sólida mostram três grupos de compatibilidade putativos que não se alinham com os grupos de homologia de aminoácidos totais. (KOVAL *et al.,* 2014)

2.2.1. FORMAÇÃO DAS JUNÇÕES COMUNICANTES

As conexinas são sintetizadas pelos ribossomos no retículo endoplasmático, sendo co-traduzidas integralmente na membrana do retículo endoplasmático rugoso (LOEWENSTEIN, 1981; SEGRETAIN & FALK, 2004; LAIRD, 2006; KIM *et al.,*2016; LILY *at al.,* 2016). Após esta etapa, a conexina é fosforilada, podendo ser oligomerizada sob forma de conexons ainda no retículo endoplasmático rugoso e transportada para o complexo de Golgi (Cx26 e Cx32), ou primeiramente transportada e só depois oligomerizada no complexo de Golgi (Cx43) (Das Sarma *et al*, 2001; Segretain & Falk, 2004). Após a oligomerização, o conexon (dentro de vesículas exocíticas) é transportado do complexo de Golgi até a membrana plasmática da célula, através de microtúbulos (Figura 12) (Musil & Goodenough, 1993; Dhein, 1998, Gaietta *et al.*, 2002; Segretain & Falk, 2004; LAIRD 2006).

> Em contraste com a maioria das proteínas oligoméricas do canal juncional, a Cx43 é estabilizada como monômeros no retículo endoplasmático (RE) e só se oligomeriza após o transporte para o complexo de Golgi. Parte desta via é regulada por uma proteína de controle, ERp29, que se liga ao segundo domínio de extracelular e estabiliza uma conformação que favorece a Cx43 monomérico em todos os tipos de células testados até o momento. Contudo, a arginina 153 na interface para TM3 é também necessária para manter o Cx43 monomérico no RE. (KOVAL *et al.,* 2014)

Através de ensaios com a proteína recombinante Cx43, utilizando técnicas de microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão (Imunoeletromicroscopia), Gaietta *et al.* (2002) observaram que as proteínas pré-formadas são inseridas nas bordas das placas de junções comunicantes localizadas na membrana plasmática. Enquanto a placa é repovoada com conexinas novas, as conexinas antigas centralizam-se, até deixarem a placa dentro de vesículas endocíticas (Gaietta *et al.* 2002).

Ao longo deste processo acredita-se que a integridade da conexina e do estado oligomerizado do conexon sejam mantidos por pontes não covalentes, sugerindo-se a existência de pontes dissulfeto intramoleculares e não intermoleculares (JOHN & REVEL, 1991; LAIRD, 2006). Estudos vêm demonstrando que a estrutura multimérica do conexon que se encontra na

membrana plasmática, parece já existir nesta conformação desde o reticulo endoplasmático rugoso (YEAGER *ET AL.*, 1998).

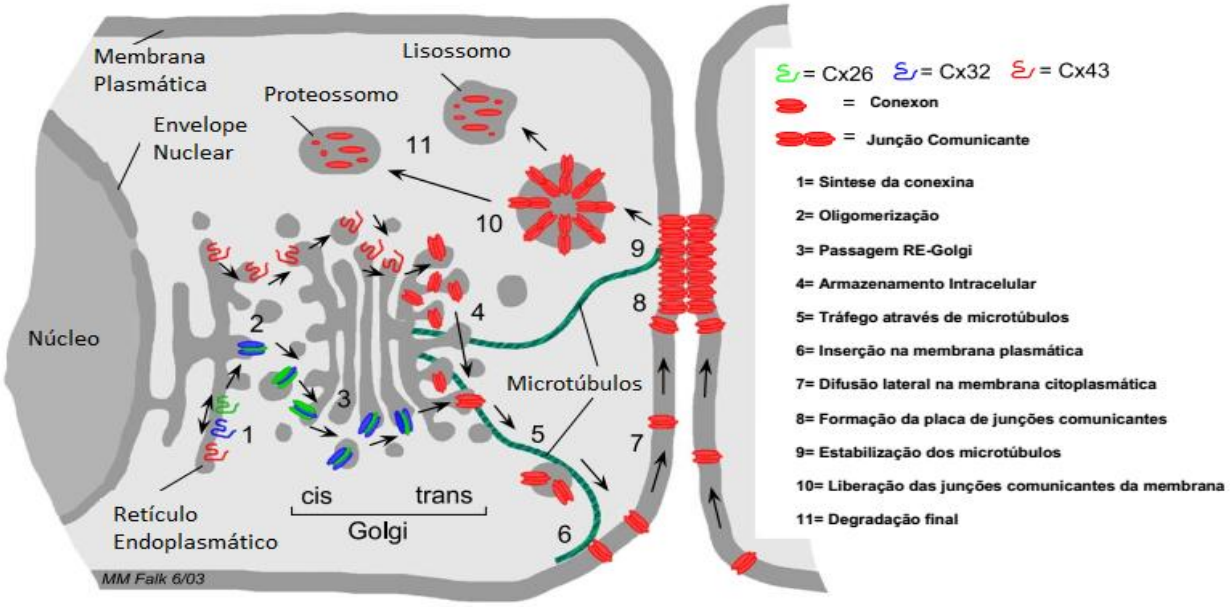


Figura 12. Esquema demonstrando a síntese, montagem e degradação das junções comunicantes dentro da célula (adaptado de Segretain & Falk, 2004).

O tempo para início de formação da junção varia de 3 a 30 minutos, com uma velocidade de formação de 1,3 canais por minuto (DHEIN, 1998; LAIRD, 2006). O canal juncional forma-se através da interação das alças extracelulares E1 e E2, sendo este processo facilitado por proteínas de adesão, como as caderinas, pois estas mantem as células em contato (MUSIL & GOODENOUGH, 1993). Após o tempo de permanência da conexina na membrana plasmática, o dodecâmero e internalizado e eliminado por vias que envolvem vesículas endocíticas, que irão se fundir com lisossomos e proteossomos (YEAGER *et al.,* 1998; GAIETTA *et al.,* 2002; SEGRETAIN & FALK, 2004). Sendo a meia vida da Cx43 de aproximadamente 1-2 h após sua síntese (Laird, Puranam, & Revel, 1991; SEVERS *et al, 2006*, LAIRD 2006).

2.2.2. FUNÇÕES DAS JUNÇÕES COMUNICANTES

Como comentado anteriormente, as junções comunicantes possuem como característica e função principal permitir que citoplasmas de células adjacentes, troquem metabolitos e informações necessárias para a manutenção dos tecidos e de suas respectivas funções (FLAGG-NEWTON *et*

al., 1979; HERVE *et al.,* 2004). Hansson and Skiöldebrand (2015) apresentaram diversas estruturas no corpo humano que possui redes de células acopladas por junções gap que expressam sistemas de sinalização para Cx43 e Ca^{2+}, relacionando a modificação destas redes a patologias do organismo. (Figura 13)

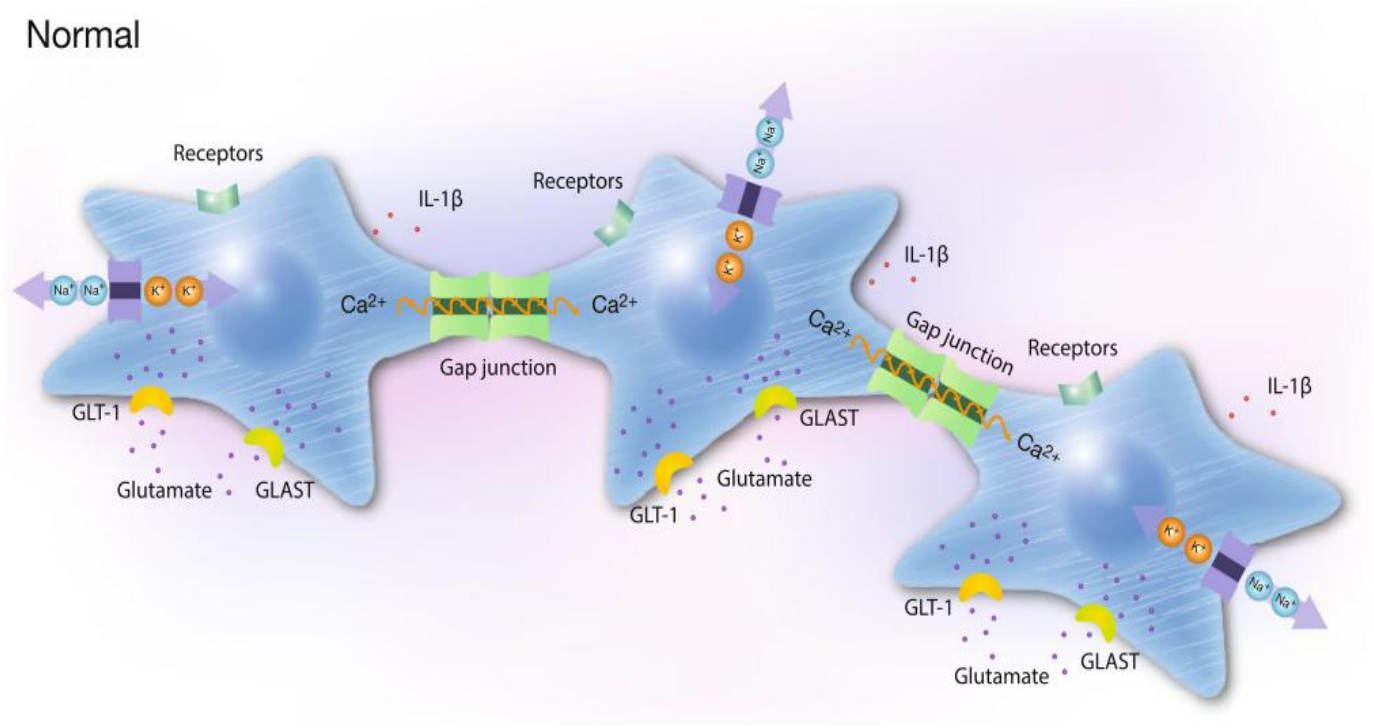


Figura 13: Ilustração esquemática de três células acopladas em rede e condições fisiológicas. As células são acopladas por junções *gap* para formar uma extensa rede celular. Receptores, bombas de íons, transportadores de glutamato, filamentos de actina (bandas brancas), liberação de citocinas e sinalização de Ca^{2+} são mostrados. O Ca^{2+} citosólico desempenha funções-chave como um segundo mensageiro e um sensor de Ca^{2+} celular detecta alterações no microambiente. Existem duas vias de comunicação: as principais vias intercelulares de junções comunicantes compreendendo a Cx43. Os receptores na superfície das células são acoplados às proteínas G e liberam Ca^{2+} do retículo endoplasmático via Fosfolipase C (PLC) e inositol trifosfato (IP3). As elevações de Ca^{2+} são seguidas pela propagação de ondas Ca^{2+} intercelulares através das junções comunicantes, que são também permeáveis a moléculas de até 1kDa, tais como Ca^{2+}, IP3 e cAMP. (HANSSON AND SKIÖLDEBRAND, 2015)

Os hemicanais formados pela Cx43 são altamente expressos em diversas células, como por exemplo, a microglia, astrócitos e endotélio, e são altamente sensíveis à (Padrões Moleculares Associados a Danos) DAMPs e (Padrões moleculares associados a patógenos) PAMPs (CONTRERAS *et al.,* 2004;

Hansson and Skiöldebrand, 2015). Considerando que os hemicanais Cx43 são rigorosamente controlados sob condições de repouso, a presença de DAMPs e PAMPs pode desencadear a abertura de poros. Os canais, quando tornam-se ativos sob condições de stress mecânico ou isquêmico e permitem a liberação de moléculas como ATP, glutamato, ou NAD^+, provocando diferentes respostas fisiológicas.(LILLY *et al.,* 2015; KIM *et al*.,2016)

A célula microglial em homeostase tem uma morfologia ramificada com um baixo nível de Cx43 (GARG *et al.,* 2005). No entanto, estímulos como danos cerebrais ou infecções ativam a microglia e aumentam a expressão da Cx43 (EUGENIN *et al.,* 2001; KIM *et al., 2016*). As alterações na expressão de Cx43 podem ser atribuídas a presença de moléculas da cascata inflamatória. (LIU *et al.,* 1994, WANG *et al.,* 1994)

Em alguns tipos celulares, como por exemplo, como em astrócitos, a Cx43 é expressa abundantemente sob condições basais (GIAUME & MCCARTHY, 1996). Em miócitos cardíacos, músculo liso ou neurônios, tal forma de comunicação intercelular também foi bem descrita e possui um papel funcional claro (SEVERS *et al.,* 2004). No tecido cardíaco esta estrutura e de extrema importância, pois representa uma via de baixa resistência elétrica, facilitando a propagação do impulso elétrico e permitindo o sincronismo de contração cardíaca essencial para o bombeamento de sangue (WEIDMANN, 1972).

Alterações na quantidade e na distribuição das junções comunicantes podem estar associadas a patologias cardíacas graves. Evidencias experimentais demonstraram que na fibrilação atrial crônica, a conexina 40 esta presente em quantidades maiores e com distribuição diferente do normal, tanto em ratos quanto em humanos (POLONTCHOUK *et al.,* 2001; LAIRD, 2006; KIM *et al., 2016*).

Dados de Green & Severs (1993) demonstraram alterações na distribuição da proteína Cx43 em corações de pacientes que desenvolveram o quadro de doença cardíaca isquêmica após o infarto do miocárdio. Com base nestes estudos, a conexina43 estava em maior quantidade na borda lateral dos cardiomiócitos e não nos discos intercalares, como encontrado em corações normais.

Ao longo do estudo das conexinas, descobertas relacionadas a mutações destas proteínas vem sendo de extrema importância para o entendimento de varias patologias. Mutações na conexina 43 podem levar ao surgimento de malformações cardíacas que levam a diminuição da sobrevida do animal, como vem sendo demonstrado em camundongos “Knockout” para Cx43 (SEVERS *et al.,* 2004).

Em humanos, os portadores de mutações na Cx43 desenvolvem defeitos, como por exemplo, o da síndrome de heterotaxia visceroatrial caracterizada pela lateralidade e transposição de grandes artérias (BRITZ-CUNNINGHAN *et al.,* 1995; CASEY *et al.,* 1995; BRUZZONE *et al.,* 1996).

No cristalino a expressão adequada das conexinas é essencial, pois por ser um tecido pouco vascularizado, ele precisa realizar trocas metabólicas com o humor aquoso mantendo o sincício celular nutrido, funcionante e principalmente sem opacidade. Neste tecido estão presentes as conexinas 46 e 50, responsáveis pelas trocas metabólicas e pela comunicação entre as células, e que ao apresentarem mutações levam ao desenvolvimento da catarata, respectivamente congênita e senil (GOODENOUGH, 1992; GONG *et al.,* 1997; WHITE & PAUL, 1999; WHITE & BRUZZONE, 2000; EVANS & MARTIN, 2002).

2.2.3. PROPRIEDADES DAS JUNÇÕES COMUNICANTES

Os canais juncionais, como todos os canais iônicos, alternam entre dois estados: aberto e fechado (UNWIN & ZAMPIGHI, 1980; KOVAL *et al., 2014*). Para um maior entendimento dos fenômenos de abertura e fechamento do canal, começaram a ser empregadas técnicas de eletrofisiologia, mais precisamente ensaios de *patch clamp*, fazendo uso da configuração de *double whole cell*, onde pares de células são analisados (WHITE *et al.,* 1985).

De acordo com o protocolo de DHEIN 1998, para a realização do experimento, uma das células tem seu potencial de membrana mantido em um valor fixo que se chama potencial de *holding* (V1), que por exemplo pode estar em -40mV, enquanto a outra célula do par tem seu potencial modificado ao longo do experimento, variando de -90mV a +10mV (V2).

Ao variar a voltagem de uma das células do par mede-se o fluxo de corrente da célula de voltagem modificada para a célula de voltagem fixa através do amplificador de *patch clamp*, que injeta corrente suficiente para que não haja variação de voltagem na célula que tem seu potencial mantido fixo. Esta corrente medida e igual e contraria a que passa através das junções comunicantes, chamada de corrente juncional ou I_j (DHEIN, 1998).

Através do *double whole cell patch clamp* em células pouco acopladas ou desacopladas transientemente por tratamento farmacológico, pode se caracterizar a condutância unitária dos canais juncionais, dada por $G_j = I_j / V$, e que varia em torno de 30 a 300 pS dependendo da conexina que forma o canal. G_j representa a condutância, I_j representa a intensidade de corrente que passa pelo canal juncional e V_j a voltagem transjuncional (VEENSTRA, 2000).

Vários fatores podem influenciar a condutância (G_j) das junções comunicantes. Um destes fatores seria a dependência de voltagem transjuncional, onde variações podem ser responsáveis pela abertura ou pelo fechamento do canal. Em canais homotípicos esta dependência de voltagem é simétrica, sendo a condutância juncional modificada quando se altera a voltagem em qualquer uma das duas células que estão sendo analisadas (SPRAY *et al.,* 1991). Já em canais heterotípicos a mudança da condutância juncional depende de qual das duas células do par analisado terá a voltagem alterada (WERNER *et al.,* 1989).

A dependência de voltagem das junções comunicantes varia de acordo com a conexina que forma o canal juncional. Por exemplo, as conexinas 40 e 45 são mais sensíveis a variações de voltagem transjuncional do que outras conexinas como a Cx43 (JONGSMA *et al.,* 1993; DHEIN, 1998). Além dos fatores biofísicos, vários fatores bioquímicos podem modular a condutância juncional, dependendo em que conexina ou tecido estão atuando.

Vias relacionadas a proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA), proteína quinase G (PKG), MAP-quinase e tirosina quinases estão intimamente ligadas a regulação das junções comunicantes (DHEIN,1998).

Em miócitos cardíacos, estudos utilizando um ativador da via da PKC, denominado TPA (ester de 12-tetradecanoilforbol-13-acetato), demonstraram que o acoplamento elétrico entre as células aumentou, mas a passagem de corante para as células adjacentes utilizando a técnica de injeção de corantes

sofreu decréscimo (SPRAY & BURT, 1990). Tal resultado foi explicado por Kwak *et al.* (1995), demonstrando que ao ser ativada a via da PKC, a frequência de ocorrência das condutâncias de canal unitário de 90 pS era diminuída, mas aumentava muito as frequências de condutâncias menores, por conseguinte aumentando o acoplamento elétrico, mas com estreitamento da luz do canal, diminuindo a passagem de moléculas maiores.

Ainda em cardiomiócitos, foram utilizados o GMPc e seus análogos a fim de estudar qual a influencia da via da PKG na G_j. através de técnicas eletrofisiologicas foram observadas a diminuição do acoplamento elétrico e modificações na frequência de distribuição das condutâncias de canais unitários nas células (PERACCHIA, 2004).

Com relação à via da PKA, muitos estudos têm observado que a estimulação desta via pode aumentar o acoplamento de junções comunicantes formadas por conexina43 em cardiomiócitos (BURT & SPRAY, 1988). Já em células HeLa transfectadas com a conexina 45, ao se utilizar 8-bromo-cAMP, ocorreu uma sensível diminuição do acoplamento elétrico e por corante (VAN VEEN *et al.,* 2000).

Outros fatores podem influenciar a condutância das junções comunicantes além destes já citados, como por exemplo, alguns íons: Ca^{2+}, Mg^{2+} e H^{+}. Concentrações elevadas de Ca^{2+} em cardiomiócitos proporcionam a diminuição do acoplamento elétrico celular (LOEWENSTEIN, 1966), mas se o pH intracelular for mantido constante tal resposta não é encontrada, acreditando-se em uma ação sinérgica entre H^{+} e o Ca^{2+} (NOMA & TSUBOI, 1987). O aumento das concentrações intracelulares de Mg^{2+}, em torno de 0,5 mM, também leva ao desacoplamento celular, sendo que as concentrações para que isto ocorra são bem maiores do que os níveis fisiologicamente toleráveis (NOMA & TSUBOI, 1987; PERACCHIA, 2004).

Outro fator importante, descrito na regulação das junções comunicantes, e o pH, que interfere na condutância juncional (diminuição) através da acidificação intracelular. Ao realizar técnicas de eletrofisiologia, analisando canais formados pela Cx43, Delmar *et al.* (2000) demonstraram que a interação da porção carboxi-terminal com uma região em separado da conexina e responsável pela sensibilidade do canal juncional a diminuição do pH celular. Ratificando os dados anteriores, neste mesmo trabalho, foi utilizada uma

proteína Cx 43 com a ausência da região carboxi-terminal, o que resultou na formação de canais juncionais funcionais em microambientes com baixo pH, demonstrando a diminuição da sensibilidade da conexina a diminuição do pH.

Associadas a formas ainda desconhecidas de atuação nas junções comunicantes, algumas drogas podem regular o acoplamento celular, diminuindo o grau de acoplamento, ou seja a comunicação entre as células. Estudos *in vitro*, utilizando por exemplo: octanol, heptanol, acido aracdônico, carbenoxolone entre outras drogas lipofílicas (DHEIN, 1998; XIA & NAWY, 2003), demonstraram que o acoplamento via junções comunicantes era reduzido drasticamente. Ao serem utilizados, o heptanol e o octanol incorporam-se a bicamada lipídica celular, diminuindo a fluidez dos domínios ricos em colesterol da membrana plasmática em que a junção comunicante esta inserida e a probabilidade de abertura do canal (DHEIN, 1998), reduzindo assim o grau de acoplamento e a comunicação celular.

2.3. SISTEMA IMUNOLÓGICO E INFLAMAÇÃO

Imunidade refere-se à proteção ou resposta contra um micro-organismo ou uma substância estranha (antígeno) mediada por uma gama de moléculas, células e tecidos, chamados de sistema imune. A resposta imunológica se divide em imunidade natural, que representa a linha de defesa inicial contra um agente patogênico, consistindo em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para responder rapidamente a infecções; E em imunidade adquirida estimulada pela exposição a agentes infecciosos, ou seja, surge em resposta a infecção e se “adapta” a infecção (Figura 14) (ABBAS, 2011).

A inflamação é uma reação complexa do tecido vascularizado à infecção, à exposição à toxina ou a lesão celular envolvendo acúmulo extravascular de proteínas plasmáticas e leucócitos (CUZZOCREA, 2005).

A inflamação aguda é um resultado comum de respostas imunes inatas. As respostas imunes adaptativas locais também podem promover inflamação (CHEN, 2010). Embora a inflamação sirva a uma função protetora no controle de infecções e promoção de reparo tecidual, também pode causar lesão e

doença (COTRAN *et al.,* 1994; MOSSMAN, 1998; WEINER, 2006 ROSS, 1999; COUSSENS, 2002; MURPHY *et al.,* 2010)

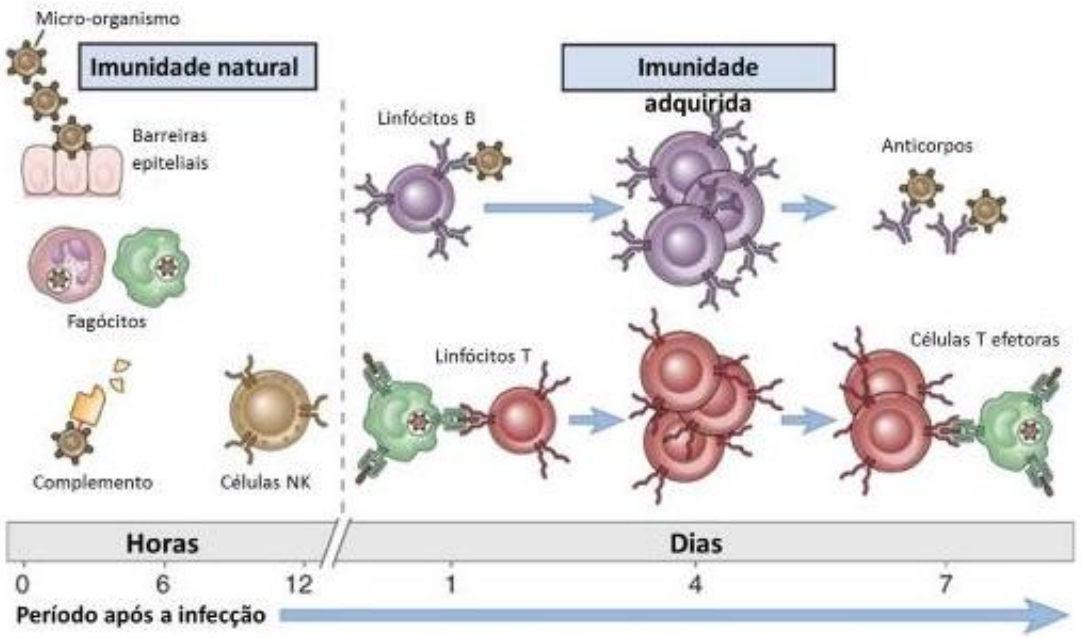


Figura 14: Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções. A resposta imune adaptativa desenvolvesse posteriormente e consiste na ativação dos linfócitos. (ABBAS, 2011)

A resposta inflamatória é mediada por vários tipos diferentes de moléculas, denominadas de mediadores químicos. Os principais mediadores inflamatórios ligados a resposta imunológica são as citocinas e quimiocinas, que vão contribuir para a imunopatogênese da inflamação (CHEN, 2010).

As citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade natural e adquiridas que medeiam muitas das funções dessas células, são polipeptídeos produzidos em resposta a micro-organismos e outros antígenos, auxiliando a regulação das respostas imunológicas e inflamatórias. As principais citocinas envolvidas na imunopatogênese do processo inflamatório são o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a interleucina 1 (IL-1). O TNF-α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda, é produzido por fagócitos mononucleares ativados, células NK (*natural killer*) e mastócitos em resposta a PAMPs. (ABBAS, 2011)

Essa citocina estimula neutrófilos e monócitos a migrarem para o sítio de infecção e induz a expressão de moléculas de adesão pelas células do endotélio vascular, permitindo assim a migração de células para os tecidos. Também induz macrófagos e células endoteliais a produzirem quimiocinas e fagócitos mononucleares produzir IL-1 que funciona em conjunto com o TNF-α na resposta inflamatória aguda aumentando a expressão de moléculas de adesão. IL-1 é produzida por fagócitos mononucleares, neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais. (CUZZOCREA, 2005) Sua produção também é induzida por PAMPs. (CHEN, 2010; TAKEUCHI, 2010)

Quimiocinas são citocinas de uma grande família estruturalmente homólogas, que estimula o movimento leucocitário e regula a migração de leucócitos do sangue aos tecidos (ABBAS, 2011).

Os componentes da imunidade natural reconhecem estruturas que são características de patógenos microbianos, produtos frequentemente essenciais para a sua sobrevivência (PAMPs) e os receptores que se ligam a essas estruturas são chamados de receptores de reconhecimento de padrões. Os receptores de reconhecimento padrão do sistema imune inato são codificados na linhagem germinativa. Diferentes classes de microorganismos (ex.: vírus, bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, fungos, protozoários) expressam diferentes PAMPs. Além de produtos microbianos, o sistema imune natural também pode reconhecer células do hospedeiro estressadas ou lesadas, que expressam moléculas que não são encontradas em abundância nas células sadias (MURPHY, 2010).

Os neutrófilos e monócitos migram dos vasos sanguíneos para o tecido inflamado via quimiotaxia, e então removem os agentes patológicos através da fagocitose e da degranulação. O primeiro passo na fagocitose é o reconhecimento do agente pelo fagócito. Os fagócitos possuem receptores de alta afinidade por moléculas de anticorpo, proteínas do complemento e os receptores de reconhecimento padrão que atuam para ativar fagócitos (ABBAS, 2011).

As principais citocinas produzidas por macrófagos ativados e suas funções são Il-1 (ativa endotélio vascular, ativa linfócitos, destruição local do tecido, aumenta o acesso de células efetoras, pode causar febre), TNF-α (ativa endotélio vascular e aumenta permeabilidade vascular, pode causar febre,

mobilização de metabólitos e choque), Il-6 (ativa linfócitos e aumenta a produção de anticorpo, pode ocasionar febre e induz a produção de proteínas da fase aguda), IL-8 (quimiocinas que recrutam neutrófilos, basófilos e células T para o local da infecção) IL-12 (ativam células NK, induz a diferenciação de células CD4+ para o perfil TH1). A destruição de microorganismos ocorre pela ação de moléculas microbicidas (MURPHY, 2010).

Os componentes da resposta imunológica natural interagem de diferentes maneiras com a resposta imune adaptativa. A resposta imunológica natural fornece sinais que agem para estimular a proliferação e a diferenciação de linfócitos T e B para antígenos específicos (Figura 15). A interação ocorre pelas células apresentadoras de antígenos (APCs); Com os fagócitos na imunidade mediada por células T, onde os macrófagos são mais eficientes na destruição de microorganismos fagocitados, e na imunidade humoral, pela opsonização (MURPHY, 2010).

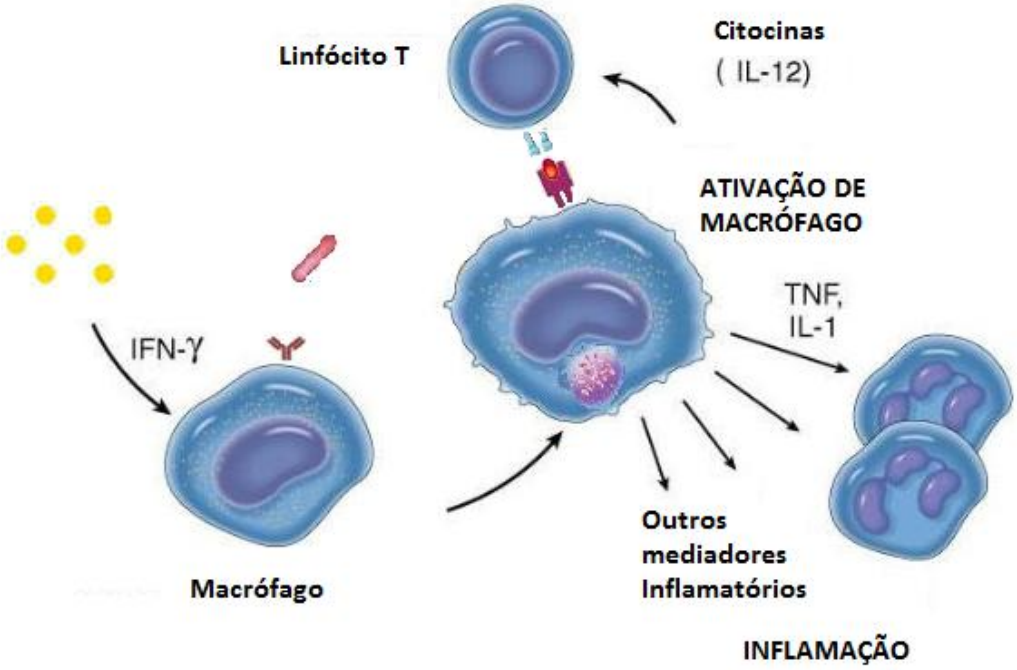


Figura 15: Organização esquemática demonstrando a ativação do macrófago pelo IFN-g, fazendo com que o mesmo: (1) fagocite microorganismo; (2) libere interleucinas; e (3) faça a apresentação do antígeno ao linfócito do tipo T (ABBAS, 2011).

A resposta inflamatória, consequentemente, está presente em todos os momentos da resposta imunológica, no inicio e efetivação da resposta inata como já descrito, na imunidade adaptativa humoral pela ativação do

complemento, na resposta adaptativa celular quando células T CD4+ ativadas por APCs liberam TNF-α intensificando ainda mais o processo inflamatório, que por sua vez tende a favorecer as células auxiliares seguir um perfil TH1; e no processo de resolução da infecção e/ou reparação tecidual (MURPHY, 2010).

2.4. MACRÓFAGOS

O sistema imune tem como uma de suas características marcantes possuir um sistema de células responsáveis pela fagocitose e pela apresentação de antígenos que irão dar origem a resposta orgânica a vários tipos de situações de invasão sistêmica por microorganismos (JAWETZ *et al.,* 1995).

O conjunto de células fagocitárias do sistema imune e originado na medula óssea, na qual *Stem Cells* ou Células Tronco se diferenciam em monoblastos, que dão origem aos monócitos, que já presentes na circulação sanguínea diferenciam-se em macrófagos (JAWETZ *et al.,*1995; ABBAS, 2011).

O macrófago é a célula mais diferenciada do sistema mononuclear fagocítico (VAN FURTH, 1972) com medida típica entre 25 a 50 µm de diâmetro. Sua superfície apresenta grande número de projeções, pseudópodes e invaginações, e o citoplasma grande com número de vesículas e vacúolos, que podem ser de secreção ou de reserva (SANTOS & DE SOUZA, 1983).

> Estruturalmente os macrófagos estão organizados da seguinte maneira: (1) o núcleo detém um aspecto ovoide ou em forma de rim, apresentando sua cromatina condensada; (2) membrana plasmática pregueada, formando reentrâncias e saliências, conferindo um aspecto superficial irregular; (3) lisossomas primários que derramam o seu conteúdo dentro de vacúolos que contem o material englobado pela célula, formando agora o que se chama de lisossomas secundários ou fagossomas, nos quais se processa a digestão. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1998) (Figura 16)

Filamentos de actina e microtúbulos estão espalhados pelo citoplasma com forte concentração próximo à superfície celular e estão envolvidos na mobilidade dos pseudópodos (DE SOUZA & BENCHIMOL, 1985), bem como no tráfico vesicular e de organelas (ALLISON *et al.,* 1971).

Na microscopia óptica, o macrófago possui um núcleo mais regular, com formato uniforme. A cromatina encontra-se dispersa. Lisossomos estão presentes espalhados pelo citoplasma, e a região do Golgi é bem desenvolvida, posicionando-se ao redor do centríolo. O retículo endoplasmático rugoso também é bem desenvolvido, estando geralmente perto do núcleo e do Complexo de Golgi (Ian, 1973). As mitocôndrias encontram-se em grande número irradiando da região perinuclear para a periferia celular (CARVALHO & DE SOUZA, 1989).

Ao longo do seu desenvolvimento o macrófago pode assumir diferentes morfologias, dependendo da sua necessidade de atuação. Quando estimulados, sendo agora denominados macrófagos ativados, os macrófagos passam a ter uma maior capacidade de secretar diversas substancias que participam do processo de defesa, o que faz com que o numero de vacúolos, de lisossomas e de outras estruturas internas aumente, modificando sua morfologia, ou ate mesmo se fusionem com outros macrófagos formando as denominadas células gigantes multinucleadas (JAWETZ *ET AL.,* 1995; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1998).

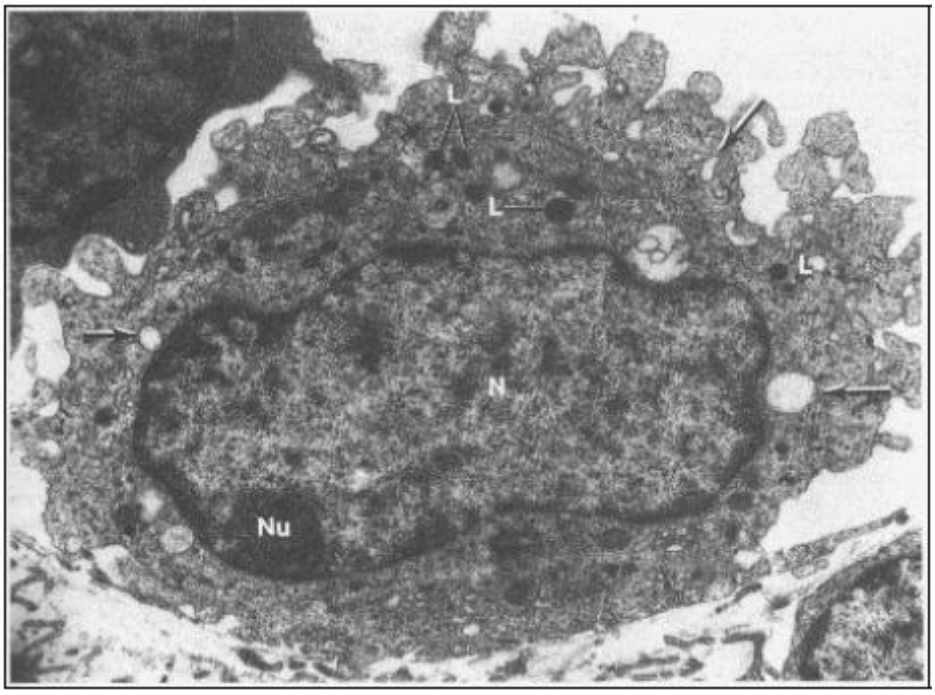


Figura 16: Micrografia eletrônica de um macrófago, apresentando a membrana pregueda e núcleo ovoide. L= Lisossomas, N= Núcleo, Nu= Nucléolo e Vacúolo fagocítico (Junqueira & Carneiro, 1998).

2.4.1. MACRÓFAGOS: FUNÇÕES E INTERAÇÃO CELULAR

Os macrófagos, ou células acessórias, detêm como funções principais: (1) a capacidade de eliminar microorganismos através de fagocitose; (2) apresentar ao sistema imune os antígenos que devem ser combatidos, portanto caracterizadas como células apresentadoras de antígenos (APCs), utilizando o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e ativar os outros tipos celulares envolvidos com a resposta imune celular. Desta forma, os macrófagos estão envolvidos com a resposta imune inata e adaptativa (ABBAS, 2011).

Na resposta imune inata está presente na primeira linha de defesa do organismo, em que este tipo de resposta dos macrófagos tem como principal função fagocitar os microorganismos presentes na invasão do organismo e ativar mecanismos de resposta a estes microorganismos (ABBAS, 2011).

A ativação de macrófagos pode ser definida como sendo a aquisição da capacidade de realizar funções complexas (ADANS & HAMILTON, 1984), funções essas que o macrófago residente não realiza. Sabe-se que a ativação dos macrófagos está relacionada à resposta imunológica inata ou específica na qual o antígeno (patógeno) inoculado é apresentado a linfócitos T que secretam citocinas, como o interferon-γ (IFN-γ), que irão ativar os macrófagos podendo, estes, serem mais ativados se entrarem em contato com lipopolissacarídeo ou TNF-α (ADANS & HAMILTON, 1984).

A fagocitose tem inicio com o reconhecimento dos microorganismos pelos macrófagos ou pela interação com o IFN-γ, produzido por células *natural killer*, ocorrendo pelo estímulo de receptores presentes na membrana desta célula, desencadeando reações intracelulares. Dentre os receptores de membrana presentes nos macrófagos estão: (1) os receptores com sete domínios transmembrana em α-hélice (ADEREM & UNDERHILL, 1999); (2) os receptores de manose; (3) a proteína que reconhece o LPS. (ABBAS, 2011).

Após esta fase e iniciada a eliminação do microorganismo, com a junção do fagossoma e dos lisossomas presentes no citoplasma contendo enzimas proteolíticas que irão digerir as bactérias presentes neste fagolisossoma. Outro mecanismo de eliminação microbiana está ligado a conversão catalítica do oxigênio molecular, onde os fagolisossomas contendo microorganismos

englobados associam-se a intermediários reativos do oxigênio (ROIs) e oxido nítrico, fazendo com que o pH dentro deste local se torne acido, eliminando o microorganismo capturado (MACMICKING *et al.,* 1997).

Na resposta imune adaptativa estão presentes os mecanismos de defesa secundários, ou seja, existe uma resposta direcionada e intensa para a infecção presente no organismo através da atividade celular ou humoral, devido a existência de um contato prévio do sistema imune com a infecção em andamento (ABBAS, 2011).

Após o reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos-T, e a migração destas células para sítios de inflamação, e produzido pelos linfócitos-T $CD4^+$ o interferon-γ (IFN-γ), que interagindo com os macrófagos faz com que estes produzam a interleucina-12 (IL-12). Além da ativação pela produção de IFN-γ, a ligação da molécula CD-40L, presente na membrana dos linfócitos-T $CD4^+$, em moléculas CD-40 na membrana dos macrófagos também aumenta a produção de IL-12 (BOEHM *et al.,* 1997).

Em resposta a ativação dos macrófagos por estes fatores, varias funções passam a se tornar constantes no sistema imune infectado. Através da ativação, os macrófagos aumentam sensivelmente sua capacidade de eliminação de microorganismos através da fagocitose, onde consequentemente os fagolisossomas associados a enzimas, a ROIs e/ou oxido nítrico com o objetivo de destruir os microorganismos com maior avidez (ABBAS, 2011).

Paralelamente aos eventos que envolvem a fagocitose, a produção de citocinas ou coestimuladores do tipo B7, que irão desencadear respostas celulares imediatas, também se encontra aumentada, e substancias como o TNF-α e interleucinas-1 e 12, irão estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos-T, amplificando a resposta imune. (SCHAIBLE *et al.,* 1999)

> Para que o macrófago possa apresentar ao sistema imune os antígenos responsáveis pela infecção, este devera expressar o que se chama de complexo de histocompatibilidade principal ou MHC caracterizado por moléculas proteicas que se associam a peptídeos antigênicos advindos da fagocitose de microorganismos e que serão demonstrados a células de defesa. As moléculas de MHC estão divididas em 2 classes, as de classe I e as de classe II, onde as ultimas estão presentes nas células apresentadoras de antígenos, entre elas nos macrófagos (ABBAS, 2011).

Inicialmente os antígenos extracelulares são fagocitados pelos macrófagos, sendo expostos a enzimas presentes nas vesículas endolisossomais intracelulares, denominadas catepsinas. Ao mesmo tempo, no reticulo endoplasmático as moléculas de MHC II são sintetizadas, passando ao complexo de Golgi onde serão empacotadas. As vesículas originadas no Golgi fundem-se com os endolisossomos, onde ocorre a degradação proteolítica da cadeia invariante (proteína que esta ligada ao MHC, e que impede que esta se ligue a outros sítios diferentes dos peptídeos advindos dos microorganismos fagocitados), liberando um sitio para ligação do peptídeo antigênico. Após o acoplamento do peptídeo, o MHCII completo e transportado e expresso na membrana plasmática do macrófago, entrando em contato com o receptor da célula de defesa (linfócito-T CD4+), apresentando o antígeno (ABBAS, 2011).

A resposta imune bem sucedida requer comunicação entre muitos tipos de células diferentes. Esta comunicação ocorre por meio de proteínas de sinalização solúveis em água, tais como quimiocinas ou citocinas (BALKWILL, 1989), pela formação de sinapses entre as células (FRIEDL *et al.,*, 2005) e a distribuição de proteínas de superfície celular (DAVIS, 2007).

2.4.2. MACRÓFAGOS E JUNÇÕES COMUNICANTES

Especificamente, estudos acerca da presença de junções comunicantes em macrófagos tiveram inicio na década de 70, quando macrófagos advindos de explantes de timo, rim e fígado foram avaliados experimentalmente por ensaios de fagocitose e apresentação de antígenos, eletrofisiologia, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. (LEVY *et al.,* 1976).

> Na microscopia eletrônica de transmissão foi observada uma orientação em cadeia linear dos macrófagos, onde havia regiões de grande contato entre as células, sendo denominado *close junctions*. Com relação aos dados eletrofisiológicos, foi registrado o acoplamento elétrico entre os macrófagos que estavam orientados de forma linear (LEVY *et al.,* 1976).

No final da década de 70, estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão em células progenitoras de macrófagos, advindas da medula óssea de cães, permitiram a analise e a identificação de regiões com a presença de junções comunicantes (PORVAZNISK & MACVITTIE, 1979).

Entretanto, no inicio da década de 80, questionamentos acerca da existência de junções comunicantes em macrófagos começaram a surgir. Estudos utilizando ensaios de cooperação metabólica em macrófagos peritoneais ativados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, não observaram a transferência de partículas marcadas radioativamente de uma célula para outra, tanto entre macrófagos como entre macrófagos e outros tipos celulares (KANE & BOLS, 1980).

Corroborando estes resultados, Dean *et al.,* em 1988, demonstraram através de injeções do corante *Lúcifer yellow* a ausência de acoplamento entre macrófagos peritoneais elicitados de camundongos ou entre co-culturas de fibroblastos com macrófagos. Neste mesmo trabalho foi observada a passagem de corante entre células adjacentes, e que segundo argumento dos autores se deve a formação de vacúolos exocíticos e endocíticos nas membranas dos macrófagos.

Em 1991 e em 1993, Beyer & Steinberg demonstraram que macrófagos de camundongo e células da linhagem macrofágicas J774 possuíam mensagem e expressão para conexina43, utilizando respectivamente técnicas de *Northen blot* e *Western blot* (transferência eletroforética de ácidos nucleicos e de proteínas, respectivamente).

Ainda em 1993 Polacek et al. demonstraram através de ensaios de *Northern blot* a expressão da conexina43 em células endoteliais, mas não em macrófagos peritoneais de camundongos e macrófagos humanos periféricos. O acoplamento entre as células foi avaliado através de injeções de corante, resultando em não acoplamento entre células endoteliais e macrófagos em cocultura, vindo a ocorrer apenas entre células endoteliais adjacentes.

Em 1996, Alves *et al.* estudaram a presença e a funcionalidade deste tipo de comunicação celular em macrófagos peritoneais de camundongos e células de linhagem macrofágicas J774-A1. De acordo com os dados obtidos tanto os macrófagos quanto as células J774-A1 expressavam Cx43, porem ao serem realizados experimentos de injeção de corantes não foi observada a passagem de corante para as células adjacentes. Com o uso de técnicas de eletrofisiologia também não foi detectada a passagem de corrente entre as células. Este trabalho concluiu que a proteína do complexo juncional estava presente, mas caso estivesse formando um canal, este não seria funcional.

Entretanto, em 1998 dados divergentes surgiram quando Martin *et al.* demonstraram que linhagens macrofágicas P388D1 e J774-A1, quando co-cultivadas com células epiteliais intestinais, se apresentavam acopladas entre si ou com as próprias células epiteliais, sugerindo que alguns fatores desta co-cultura poderiam determinar a formação de junções comunicantes funcionais.

Em concordância com os dados acima mencionados, Saez *et al.* (2000), utilizando a linhagem macrofágica J774-A1 observaram o acoplamento celular através de injeção de corantes. No entanto, este efeito só foi observado após um tratamento prévio com um meio de cultura condicionado, sugerindo que este meio, obtido da cultura de células endoteliais da microcirculação de cérebro de rato, deveria conter fatores que modulariam a comunicação juncional em macrófagos.

No ano seguinte, Eugenin *et al* (2001), através das técnicas de *western blot*, imunofluorescência e injeção intracelular de corantes, demonstraram que culturas de microglia advinda de cérebros de ratos apresentavam junções comunicantes funcionais, apenas quando estas culturas eram incubadas com interferon-γ + TNF-α (Fator de Necrose Tumoral-α) e interferon-γ + lipopolissacarideo (LPS).

No entanto, Eugenin *et al*. (2003) observaram que monócitos/macrófagos oriundos do sangue de humano, apresentam junções comunicantes funcionais apos 24 horas de incubações com interferon-γ + TNF-α e interferon-γ + lipopolissacarídeo (LPS), igualmente aos dados encontrados por este mesmo grupo em experimentos semelhantes com microglia, em 2001. Entretanto, podemos inferir que estes dados conflitantes demonstrados até o presente momento podem estar relacionados ao fato dos macrófagos utilizados nos experimentos terem sido obtidos de fontes diferentes (peritônio, sangue e cérebro).

No entanto, Fortes (2004) demonstrou através de ensaios de RT-PCR, *western blot*, imunofluorescência e injeção de corantes, que células da linhagem macrofágica J774-G8 e macrófagos peritoneais advindos de camundongos suíços expressam junções comunicantes funcionais formadas pela proteína conexina43, sem a necessidade de qualquer tratamento com citocinas. Assim, foi caracterizada a presença deste tipo de comunicação em macrófagos.

De acordo com diversos achados, ainda é possível inferir que as junções comunicantes tenham outros papéis potencialmente importantes na resposta imunológica, como por exemplo, o de "alertar" células vizinhas através de moléculas de sinalização, o que pode ajudar no recrutamento de componentes associados à resposta imunológica inata e adaptativa.

2.5. JUNÇÕES COMUNICANTES X TOXOPLASMOSE

As junções comunicantes também executam um papel de destaque em estudos associados às infecções parasitárias. (CAMPOS DE CARVALHO *et al*, 1998) Estudos que envolvem a interação de macrófagos com *T. gondii* tem demonstrado que o parasita também possui capacidade de inibir a ativação de macrófagos (Lüder *et al*., 2017) e reduz o acoplamento e a expressão de conexina entre astrocitos e células da leptomeninge parasitadas, levando a crer que esta pode ser uma resposta celular geral à infecção com parasitas intracelulares (CAMPOS DE CARVALHO *et al*, 1998)

Este parasita possui diversos mecanismos de escape e promove alterações na célula parasitada para promover a manutenção de sua sobrevida, como demonstrado por Seabra *et al*. (2002), em que macrófagos de camundongo ativados com IFN-γ e LPS infectados com taquizoítas de *T. gondii* tem a produção de NO inibida devido à redução da expressão da iNOS no processo de infecção. Além disso, foi demonstrada a presença de mecanismos de escape da ação microbicida de macrófagos ativados envolvendo a exposição de Fosfatidilserina (FS), mimetizando a apoptose e facilitando a infecção (Santos *et al* 2011).

Campos de Carvalho *et al*, (1998) Afirmou que tanto o *T.* gondii quanto o *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) influenciam as junções comunicantes de uma forma semelhante, sugerindo que a diminuição na comunicação juncional poderia ser resultado de mudanças secundárias no metabolismo celular devido à infecção. Estudos com o protozoário *T. cruzi* demonstrando que a infecção parasitária alterou não só a produção de citocinas, como também o padrão de atividade de comunicação intercelular por junções comunicantes. Este demonstrou a modificação do padrão estrutural da organização das

comunicação juncional, bem como o seu perfil funcional Goldenberg *et al* (2000).

Astrócitos e células da meninge (pia-máter e aracnoide) quando infectadas *in vitro* e *in vivo* por *T. cruzi* e *T. gondii*, também apresentaram redução no acoplamento celular e na marcação para Cx43 e Cx26, entretanto os níveis totais de proteína Cx43 não são significativamente alterados, sugerindo que a infecção interrompe o tráfico e a montagem da proteína em canais funcionais na membrana plasmática. (CAMPOS DE CARVALHO *et al*, 1998)

Estudos em ratos e cardiomiócitos de ratos após a infecção por *T. cruzi* demonstraram que a Cx43 de células infectadas foi substancialmente inferior a 72 h após a infecção. Entretanto o acoplamento entre células não parasitadas não foi alterado pelas células infectadas, indicando que os fatores segregados para o meio não são susceptíveis de ser responsável pela diminuição da Cx43, indicando que as alterações na distribuição e funcionalidade de Cx43 estão relacionadas com a presença do parasito na célula independente de fatores solúveis envolvidos na infecção (CAMPOS DE CARVALHO *et al.,* 1992).

Recentemente Nogueira *et al.* (2015) demonstrou que a infecção por *T. gondii* induz mudanças no complexo juncional de células epiteliais de pigmento da retina, alterando as junções de adesão. Mostrando mais uma vez que este parasita promove alterações na homeostase celular, gerando alterações no complexo juncional presentes nas patologias causadas pela infecção.

3. MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. CULTURA DE CÉLULAS DE LINHAGEM MACROFÁGICA J774-G8

A linhagem de células macrofágicas J774-G8 (UNKELESS *ET AL*, 1979), derivada da linhagem americana original J774-A1 obtida de camundongo (American Type Culture Collection - ATCC, Rockville, MD), foi cedida pelo Laboratório de Pesquisa em Timo na Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz. As células foram plaqueadas, com uma densidade inicial de $1x10^6$ células/ml, em garrafas de plástico de 25 cm^2 (CORNING / USA), em lamínulas de vidro número 1 (Fisherbrand / Fisher Scientific).

As culturas foram mantidas em meio DMEM *(Dulbecco´s modified Eagle´s medium)*, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (V/V) (GIBCO), penicilina 1000UI/ml e estreptomicina 100UI/ml (Sigma- Aldrich). As células foram mantidas a 37^0C em atmosfera úmida a 5% de CO_2.

3.2. OBTENÇÃO DE TAQUIZOÍTA DE *T. gondii*

Taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH), cedidos pelo Laboratório de Tecnologia em Cultura de Células (LTCC) do Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), chefiado pelo Prof Sérgio H. Seabra.

A obtenção e manipulação dos parasitas foram descritas por Padrão *et al.* (2014).

3.3. INTERAÇÃO PARASITO-CÉLULA

As células foram plaqueadas em garrafas de plástico de 25 cm^2 ou em lamínulas de vidro (número 1) organizadas na placa de 24 poços. Após 48h a cultura atingiu a confluência (Freshney, 2005). O taquizoíta de *T. gondii* foi ressuspendido em meio DMEM e colocado em contato com a célula na proporção 10 parasitas para cada célula. Este foi mantido 1 hora em estufa 37^0C em atmosfera úmida a 5% de CO_2. Em seguida, o meio foi descartado e substituído por DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, penicilina 1000UI/ml e estreptomicina 100UI/ml e foram mantidas a 37^0C em atmosfera úmida a 5% de CO_2, no período de 24, 48 e 72 horas.

3.4. TRATAMENTO COM FATORES PRO IMUNO-INFLAMATÓRIOS

Os ensaios de tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios foram feitos em garrafas de plástico de 25cm^2 (CORNING / USA) e em lamínulas de vidro número 1 (Fisherbrand Fisher Scientific), ou em placas de cultura de plástico de 35mm de diâmetro com células de linhagem macrofágica J774-G8 ativadas com 1 ng/ml de interferon-γ recombinante de camundongo (IFN-γ; Sigma), 1ng/ml de TNF-α e 100 ng/ml de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; Sigma) numa janela de 24h, 48h e 72h. (SEABRA, 2002)

Os ensaios foram feitos com os fatores de forma combinada ou de forma isolada, da seguinte forma: IFN-γ, TNF-α e TNF-α + IFN-γ.

3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), que detecta concentrações da ordem de mg/mL de proteína. Cinco mililitros de reagente de Bradford, composto por Comassie Brilliant Blue G-250 10% (P/V), etanol 5%, acido fosfórico 10% e água, foram adicionados a amostra a ser dosada. As alíquotas são distribuídas em triplicatas de diferentes concentrações. Estas foram homogeneizadas e comparadas a uma curva padrão obtida com albumina bovina sérica (1mg/mL). As leituras da densidade ótica foram realizadas em comprimento de onda (ʎ) de 595nm em espectrofotômetro (SHIMADZER, modelo UV-2450).

3.6. IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA

As células estudadas pela técnica de transferência imunoeletroforética ou *Western Blot* foram lavadas e raspadas em uma solução de bicarbonato de sódio, pH: 8.3, e centrifugadas a 10000 x g durante 10min. Foi adicionado 3 ml de Tween 20 1% e homogienizado com o auxilio do vortex. O material foi centrifugadas a 10000 x g durante 5 min e ressuspenso em e armazenadas em solução de bicarbonato de sódio, pH: 8.3 com o coquetel de inibidores de proteases (Inibidores de protease: PMSF – 50 mM em etanol; Leupeptina – 5 mg/ml; EDTA - 200 mM; Aprotinina – 10 mg/ml; E-64 – 1 mM; Pepstatina – 1

mg/ml; Antipaina – 10 mM; 0-fenantrolina – 200 mM). . O material foi armazenado a -20°C.

A separação das proteínas presentes na célula J774-G8 foi feita através da técnica de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Foi adicionado 23 µg de proteína nos géis que foram preparados em duplicatas, em placas de 1.5 mm de espessura. O gel de empacotamento (stacking gel) foi feito numa concentração a 4% e o gel de corrida (running gel) foi feito numa concentração a 10% em todos os tipos celulares estudados. As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris-Cl, 125 mM; SDS, 4%; glicerol, 20%; β-mercaptoetanol, 10%; azul de bromofenol, 0,4%; pH 6,8) e mantida a temperatura ambiente por cerca de 60 minutos antes de sua aplicação no gel. A corrida eletroforética foi realizada a voltagem constante de 150 mV por 2 horas (sistema BIO-RAD).

Após a corrida eletroforética o gel foi colocado em contato com um papel de nitrocelulose em solução tampão (Tris-OH, 25mM; glicina, 192mM; metanol, 20%; pH 8,3) e a transferência realizada sob uma corrente constante de 300 mA por 2 horas (sistema BIO-RAD). A transferência ocorreu a 100V por 1h e o gel foi corado para se avaliar o grau de transferência e a nitrocelulose, em seguida, este foi incubado em tampão TBS (Tris Buffer Saline) contendo leite em pó desnatado Molico^{R} a 5%, e Tween 20 a 0.5% por 30 min, seguindo-se de lavagens com TBS contendo Tween 20 a 0.5% (TBS-T) por 5 vezes durante 5 minutos por vez.

A membrana foi incubada por 17 horas a 4ºC sob agitação com anticorpo policlonal produzido em coelho imunizado com peptídeo sintético correspondente a sequencia de aminoácidos 346-360 da região carboxi-terminal da conexina 43 diluído na proporção de 1:1000 em TBS-T contendo leite em pó desnatado Molico^{R} a 3%. Após a incubação lavamos a nitrocelulose com TBS-T como descrito anteriormente, sendo logo depois incubada com anticorpo secundário diluído na proporção de 1:5000 em TBS-T contendo leite em pó desnatado Molico^{R} a 3%, este está ligado a *horseradish peroxidase* para quimioluminescência, por 2 horas. Após nova lavagem com TBS-T, a nitrocelulose foi incubada com a solução de ECL (Substrato de peroxidase para quimioluminescência) acrescentada a Peróxido por 10 minutos para revelação

no sistema ChemiDoc MP imaging system BIO-RAD, e avaliado pelo programa Image lab 5.1.

3.7. IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células foram fixadas com formaldeído 4% durante 1h em temperatura ambiente. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS-TRITON X-100R em uma concentração de 0,3%, três vezes durante 30 minutos, e logo em seguida incubadas com albumina sérica bovina (BSA-Bovine Serum Albumin, SIGMA) isenta de imunoglobulinas, diluída em PBS a 2% por 30 minutos. Após o bloqueio as células foram incubadas com o marcador de citoesqueleto Faloidina (F-actina) conjugado com o fluorocromo ALEXA 546 em uma diluição de 1:100 por 2 horas. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, três vezes por 10 minutos e incubadas com anticorpo policlonal anti-Cx43 descrito na seção de transferência imunoeletroforética, em uma diluição de 1:100 por 2 horas.

Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS, três vezes por 10 minutos, e incubadas com anticorpo secundário ALEXA 488 (na diluição de 1:400 (invitrogen). Após a lavagem com PBS, como descrito anteriormente, as lamínulas foram marcadas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para marcar o núcleo das células. Elas foram montadas sobre laminas que continham 10 µl de Prolong gold^{R}, uma solução que reduz o decaimento da fluorescência.

As marcações nas laminas foram observadas em um microscópio de epifluorescencia AXIOVERT 40 Plus Carl ZEISS (Photo microscope), excitadas com iluminação por lâmpada de mercúrio de alta pressão, HBO 50W, (λ = 490 nm) sendo a emissão monitorada utilizando um conjunto de filtros de emissão para fluorescência de fluoresceína (λ = 525nm). A especificidade da imunoreatividade foi avaliada na ausência do anticorpo primário.

Os experimentos foram submetidos à observação e análise simples ou de secções no plano Z (reconstrução tridimensional) utilizando o microscópio confocal LSM 710 QUASAR (Carl ZEISS, Oberkochen, Germany).

A especificidade das imunomarcações foi avaliada utilizando o mesmo protocolo acima, substituindo os anticorpos primários nas incubações por

soluções de PBS com albumina sérica bovina a 0,1%. Nenhuma marcação foi observada nestas condições.

3.8. INJEÇÃO DE CORANTE

A permeabilidade das junções comunicantes para moléculas de baixo peso molecular (até 1KDa) foi avaliada quantitativa e qualitativamente através de microinjeção intracelular nas células cultivadas com o corante *Lucifer Yellow* CH (PM: 457.2 Da, SIGMA) por meio de pulsos de corrente hiperpolarizante aplicados a microeletródios com resistência em torno de 5mΩ contendo solução a 5% (P/V) de *Lucifer Yellow* CH (PM: 457.2 Da, SIGMA) em 150 mM de LiCl (Cloreto de Lítio).

Os campos injetados foram fotografados com uma maquina fotográfica digital Magnafire, em exposição automática para campo claro, e exposição de 20 segundos para os campos com fluorescência, 1 minuto e 30 segundos após a injeção intracelular de corante. Os experimentos foram feitos em placas de Petri de 35mm, sendo estas utilizadas por um tempo máximo de 60 minutos.

As células foram observadas em um microscópio de epifluorescência AXIOVERT 100 Carl ZEISS (Photo microscope), excitadas com iluminação por lâmpada de mercúrio de alta pressão, HBO 50W, (ʎ= 490nm) sendo a emissão monitorada utilizando um conjunto de filtros de emissão para fluorescência de fluoresceína (ʎ= 525nm).

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi plotada no programa Prism da Graphpad. Os testes Qui-quadrado e One Way Anova foram utilizados para a análise inferencial em um nível de significância inferior a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. FATORES PRÓ-IMUNOINFLAMATÓRIOS: CRESCIMENTO CELULAR E ASPECTOS MORFOLÓGICOS

A Linhagem Macrofágica J774-G8 foi submetida ao tratamento com os fatores pró-imune inflamatórios IFN-γ e TNF-α, e de forma combinada associando o TNF-α + IFN-γ a fim de analisar o perfil da comunicação juncional em um microambiente que tente reproduzir um ambiente inflamatório. Para tanto, foram feitos tratamentos em tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação com os fatores.

Antes de realizar a análise funcional da comunicação intercelular, foram feitos estudos que pudessem demonstrar possíveis mudanças dinâmicas no crescimento celular, que envolve o tempo de crescimento das células e a morfologia das células quando tratadas com os fatores em comparação a situação controle (sem tratamento).

Na figura 17 é possível observar micrografias de contraste de fase do crescimento das células J774-G8 no período em que as culturas atingiram 24 horas de incubação com os fatores, sendo comparadas com as culturas do grupo controle (figura 17 A): IFN-γ (figura 17 B), TNF-α (figura 17 C) e TNF-α + IFN-γ (figura 17 D).

Na figura 18 são demonstradas as micrografias de contraste de fase das células J774-G8 incubadas durante 48 horas com os fatores: IFN-γ (figura 18 B), TNF-α (figura 18 C) e TNF-α + IFN-γ (figura 18 D). O grupo controle está representado na figura 18 A.

Em 72 horas (figura 19), é demonstrado o grupo controle (figura 19 A) e os tratamentos com: IFN-γ (figura 19 B), TNF-α (figura 19 C) e TNF-α + IFN-γ (figura 19 D).

Todas as micrografias foram realizadas em aumentos de 100X (objetiva de 10X), com o objetivo de apresentar um panorama do crescimento geral da cultura.

Com base nos resultados obtidos, observamos que em incubações envolvendo o período de 48 horas, as células J774-G8 apresentaram um considerável crescimento celular com a formação de grupos celulares (grumos

de células) após tratamento com TNF-α + IFN-γ, quando comparadas com as culturas que foram incubadas em tempos diferentes (24 e 72 horas).

Este resultado pode nos indicar que a organização celular em grupos deva indicar uma maior necessidade de troca de informações, uma vez que o ambiente está sendo ativado, mesmo que não estejamos mimetizando um microambiente completo.

Célula J774-G8 (24 horas)

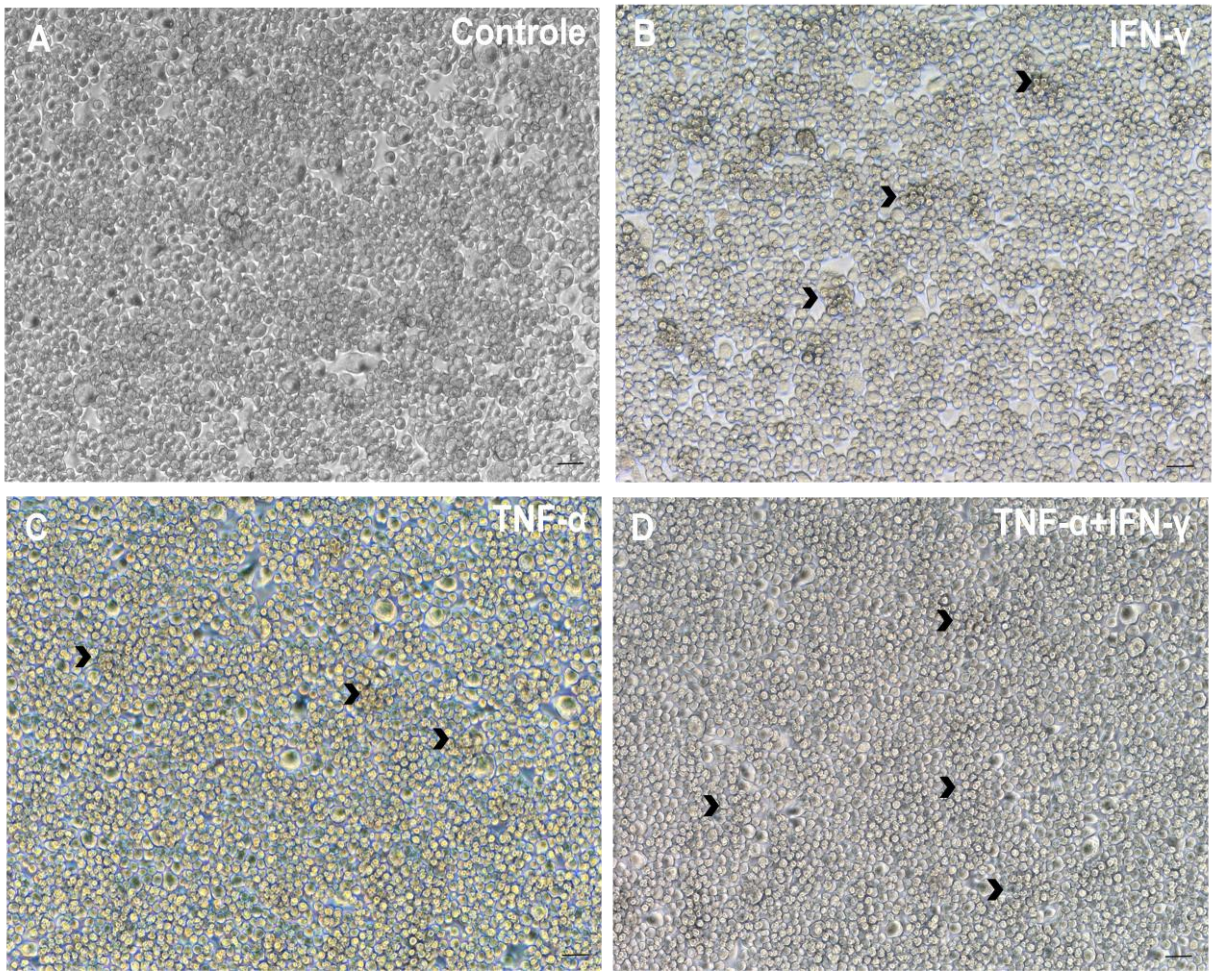


FIGURA 17: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Está sendo demonstrado o perfil de crescimento celular nos grupos controle (A) e após a incubação de 24 horas com os fatores: IFN-γ (B), TNF-α (C) e TNF-α + IFN-γ (D). A ponta da seta indica os grumos celulares. Barra de calibração 50µm. Aumentos de 100X (Objetiva de 10X).

Célula J774-G8 (48 horas)

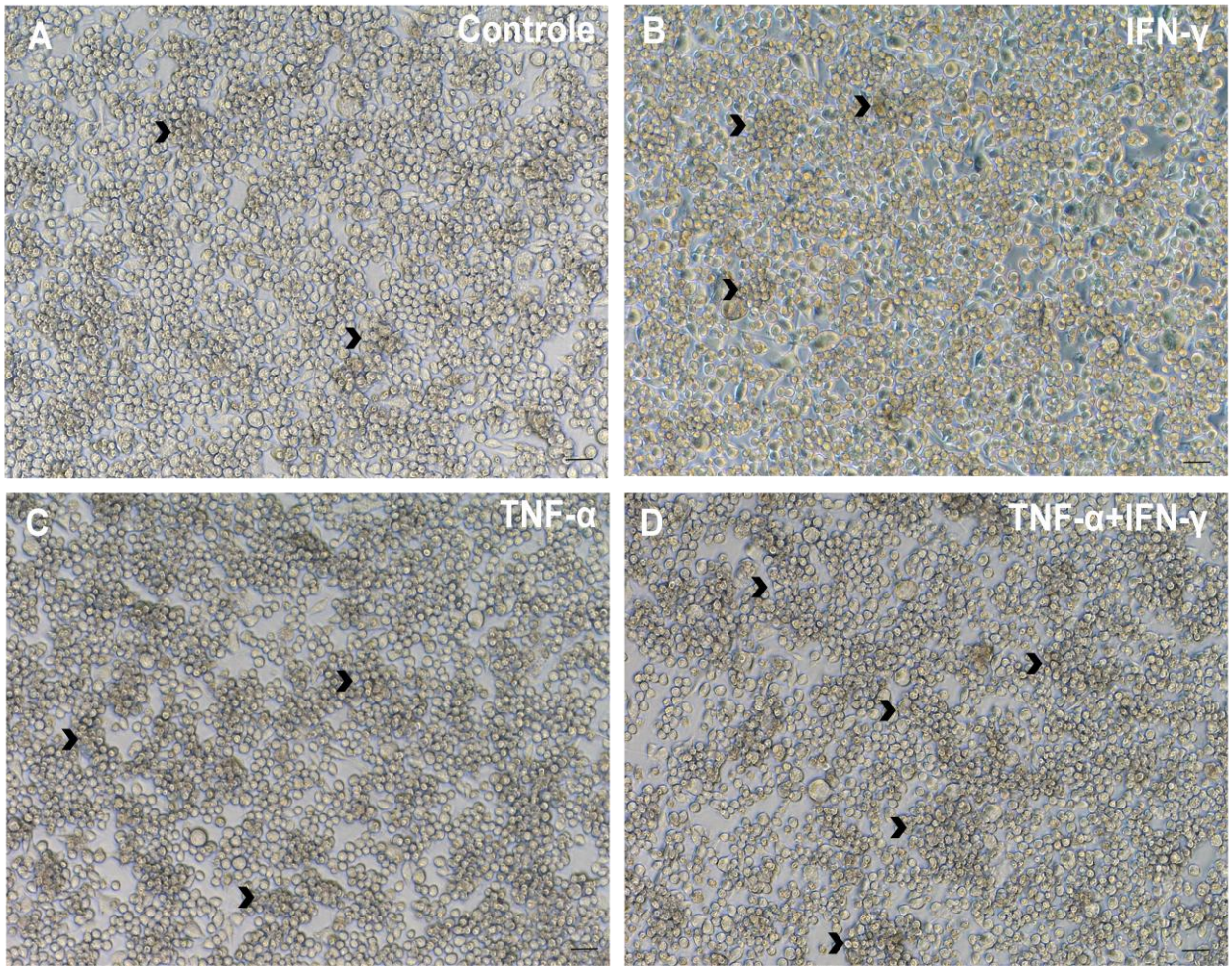


FIGURA 18: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Está sendo demonstrado o perfil de crescimento celular nos grupos controle (A) e após a incubação de 48 horas com os fatores: IFN-γ (B), TNF-α (C) e TNF-α + IFN-γ (D). A ponta da seta indica os grumos celulares. Barra de calibração 50µm. Aumentos de 100X (Objetiva de 10X).

Célula J774-G8 (72 horas)

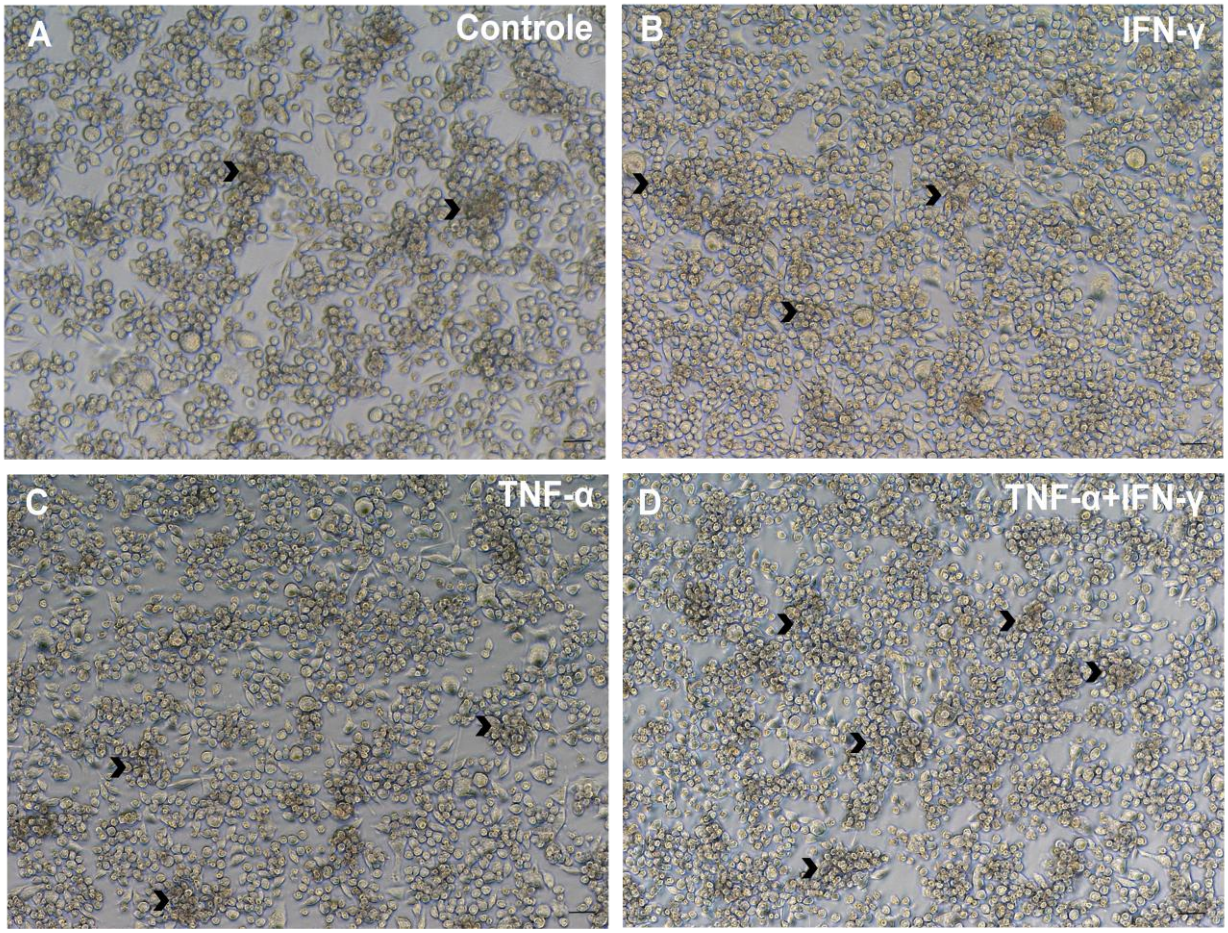


FIGURA 19: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Está sendo demonstrado o perfil de crescimento celular nos grupos controle (A) e após a incubação de 72 horas com os fatores: IFN-γ (B), TNF-α (C) e TNF-α + IFN-γ (D). A ponta da seta indica os grumos celulares. Barra de calibração 50µm. Aumentos de 100X (Objetiva de 10X).

Na figura 20 as micrografias de contraste de fase mostram os aspectos morfológicos das células J774-G8 nos grupos controle (figura 20 A) e tratado com: IFN-γ (figura 20 B), TNF-α (figura 20 C) e TNF-α + IFN-γ (figura 20 D) após a incubação das culturas por 24 horas. O mesmo foi aplicado à figura 21 e a figura 22 mostrando o grupo controle (figura 21 e 22 A) e tratados com: IFN-γ (figura 21 e 22 B), TNF-α (figura 21 e 22 C) e TNF-α + IFN-γ (figura 21 e 22 D) em 48 e 72 horas respectivamente.

Comparando os grupos controle e tratado, observamos que não houve alterações morfológicas das células nos tempos avaliados (24, 48 e 72 horas),

no entanto é possível observar a formação dos grupos celulares com mais detalhes. Foram utilizados aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

A figura 23 apresenta o gráfico comparativo gerado a partir da análise do número de grumos observados durante o tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios em todos os horários de tratamento. Observou-se que a maior quantidade de grumos em cultura esteve presente no horário de 48h após o tratamento com IFN-γ, decaindo no horário de 72h. No tratamento com TNF-α a maior quantidade de grumos é observada em 48h, apresentando decréscimo de formação de grumos no período também de 72h.

Os fatores conjugados apresentaram uma maior formação de grumos em 24h de tratamento, sendo este o maior pico comparado a todos os horários e tratamentos utilizados, o que pode ser explicado por uma ação aguda e combinada destes fatores, como ocorre em microambientes inflamatórios. Com o avançar dos tempos de incubação, os grumos formados nas placas diminuíram em número, mas apresentaram um volume de concentração celular maior.

Célula J774-G8 (24 horas)

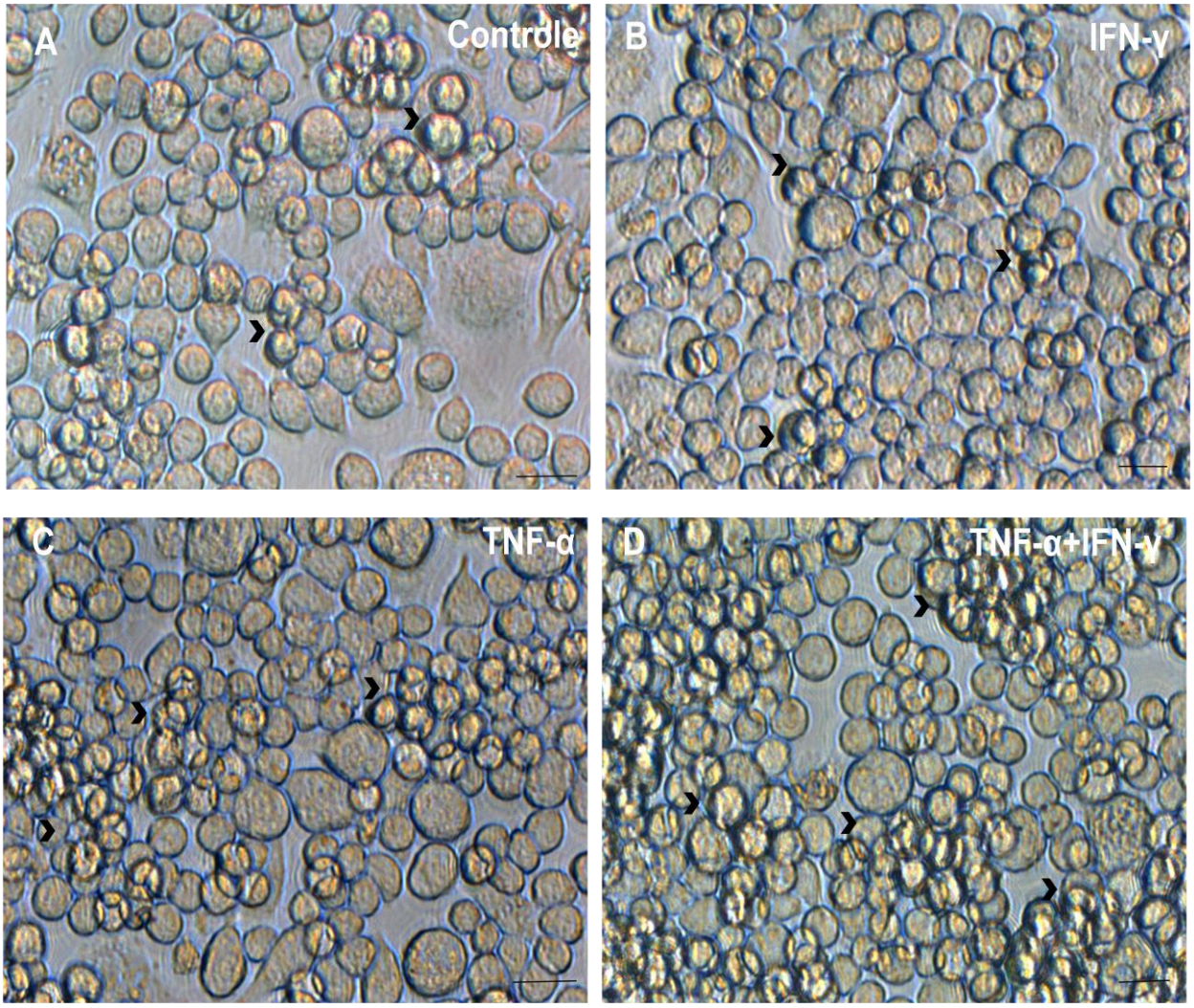


FIGURA 20: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Está sendo demonstrado o perfil morfológico celular nos grupos controle (A) e após a incubação de 24 horas com os fatores: IFN-γ (B), TNF-α (C) e TNF-α + IFN-γ (D). A ponta da seta indica os grumos celulares. Barra de calibração 20µm. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

Célula J774-G8 (48 horas)

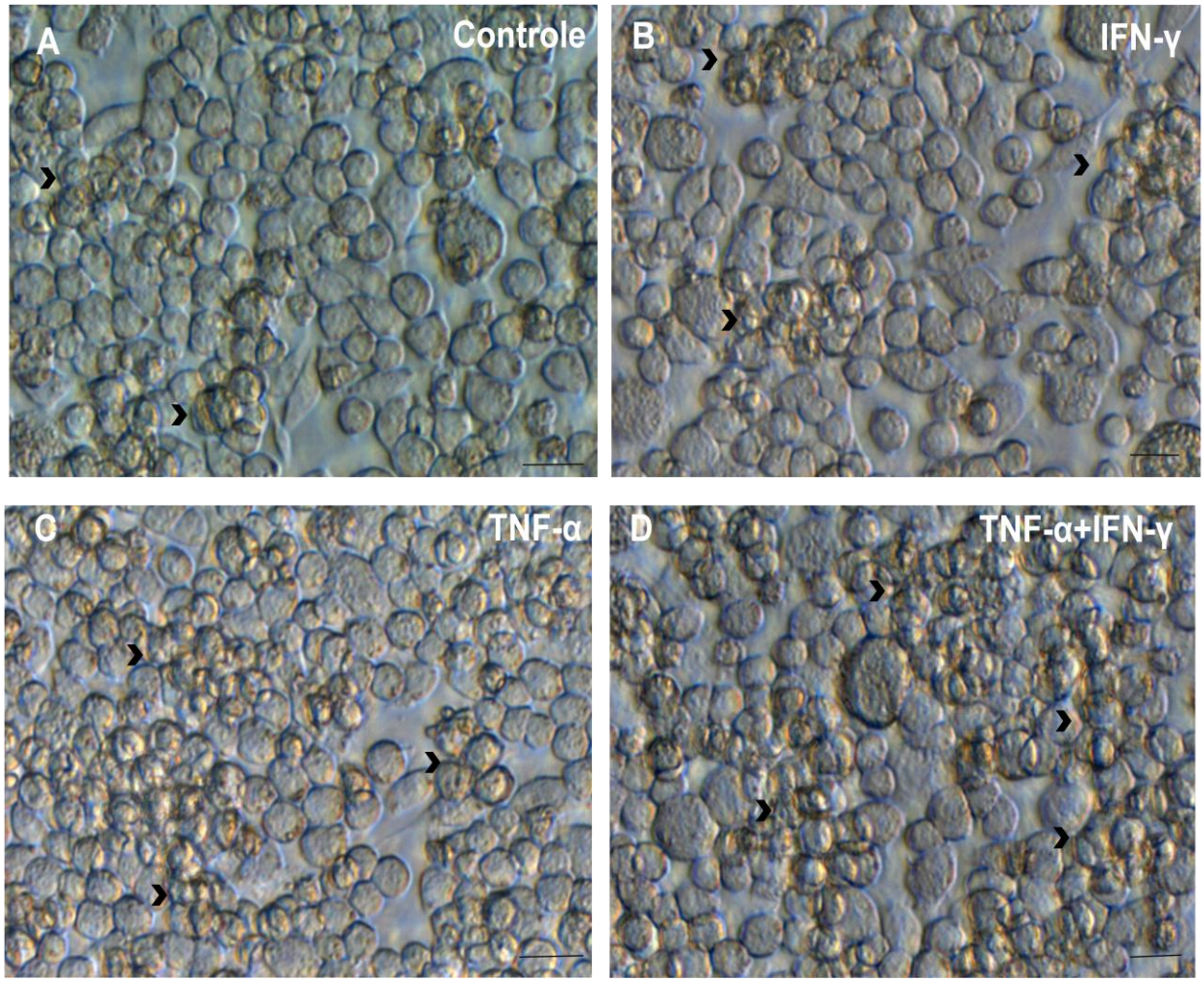


FIGURA 21: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Está sendo demonstrado o perfil morfológico celular nos grupos controle (A) e após a incubação de 48 horas com os fatores: IFN-γ (B), TNF-α (C) e TNF-α + IFN-γ (D). A ponta da seta indica os grumos celulares. Barra de calibração 20µm. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

Célula J774-G8 (72 horas)

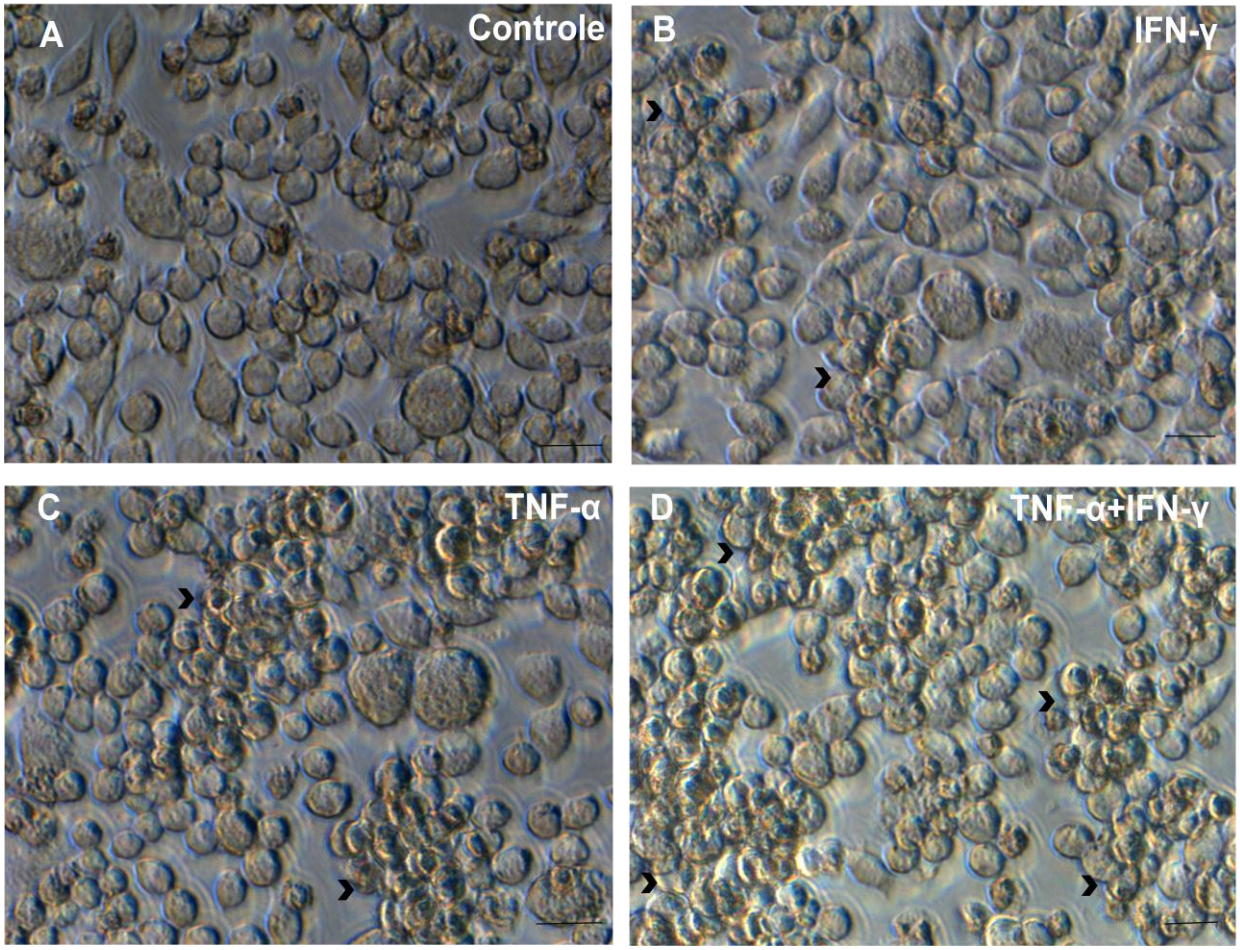


FIGURA 22: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Está sendo demonstrado o perfil morfológico celular nos grupos controle (A) e após a incubação de 72 horas com os fatores: IFN-γ (B), TNF-α (C) e TNF-α + IFN-γ (D). A ponta da seta indica os grumos celulares. Barra de calibração 20µm. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

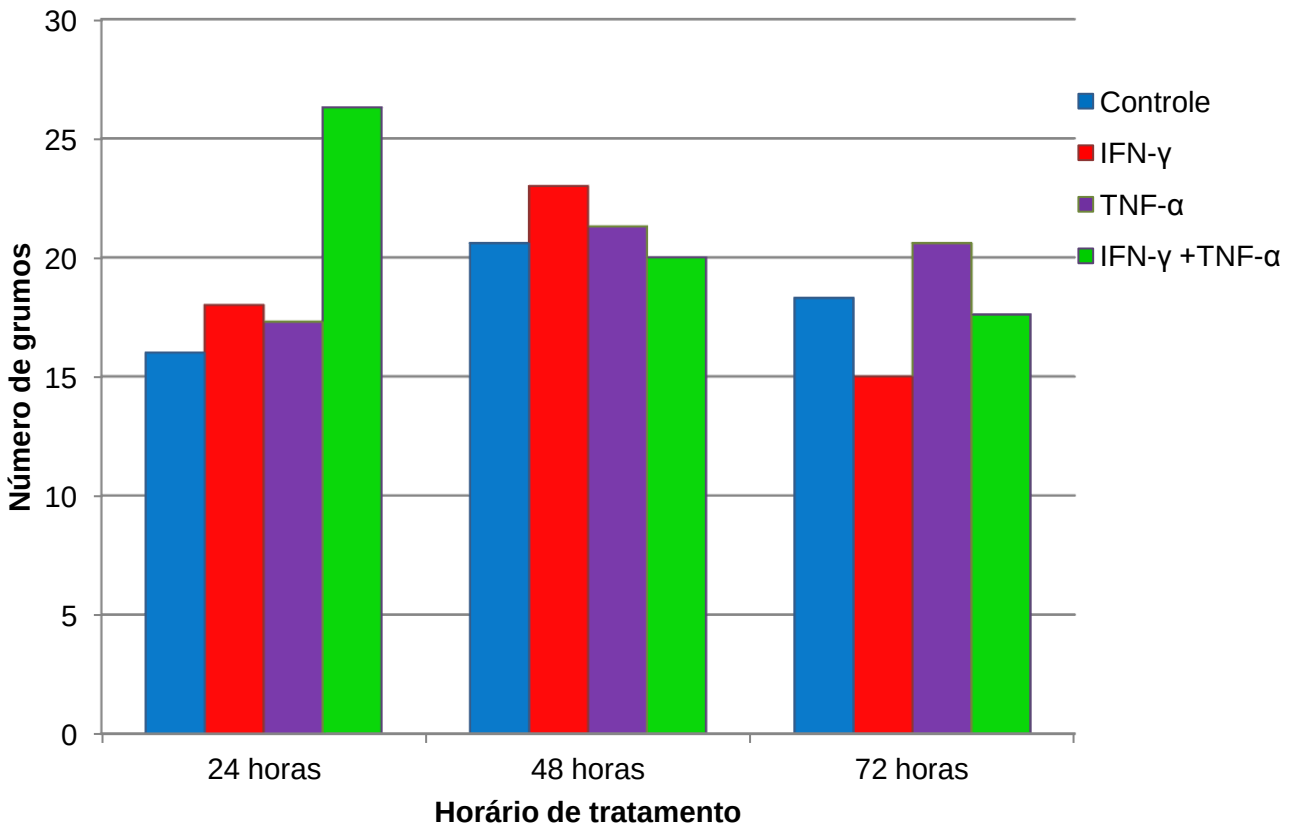


FIGURA 23: Gráfico comparativo do número de grumos celulares nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 controle e após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios IFN-γ, TNF-α e TNF-α + IFN-γ, em períodos de 24, 48 e 72 horas. Total de experimentos: 3.

4.2. TRATAMENTO COM OS FATORES PRÓ-IMUNO INFLAMATÓRIOS: COMUNICAÇÃO CELULAR

Com o objetivo de estudar o acoplamento intercelular através de junções comunicantes em macrófagos foram realizados experimentos de injeção de corante em culturas da Linhagem Macrofágicas J774-G8 controle, 24, 48 e 72 horas após o tratamento com IFN-γ, TNF-α e TNF-α + IFN-γ. Este ensaio nos permite testar a funcionalidade das junções comunicantes através de injeções intracelulares de moléculas fluorescentes de baixo peso molecular. Especificamente em nosso estudo injetamos o corante “Lucifer Yellow” (peso molecular: 457.2 Da) nas células J774-G8.

Os gráficos presentes na figura 24, figura 25, e figura 26 representam, respectivamente, o acoplamento celular no período de 24, 48 e 72 horas de incubação com os fatores pró-imune inflamatórios.

Com 24 horas de incubação utilizando os fatores pró-imuno inflamatórios (figura 24), podemos destacar o aumento no acoplamento das células à célula injetada com o corante, quando comparadas com as células controle. Este aumento se dá principalmente quando as culturas passam pelo tratamento combinado com TNF-α + IFN-γ, em que 50 % das células injetadas estavam acopladas a um número de 7 à 8 células.

O acoplamento ascendente continuou a ser observado em 48 horas de incubação com os fatores inflamatórios, merecendo destaque também o grupo experimental utilizando os fatores combinados (TNF-α + IFN-γ) em que quase 60% das células estão acopladas a mais de 9 células (figura 25).

Em 72 horas de incubação com os fatores pró-imune inflamatórios, o índice de acoplamento celular começou a sofrer um decréscimo, principalmente quando observados os números de células acopladas à célula injetada nas classes de 7 á 8 células (20%), ou mais de 9 células (5%) (figura 26).

A figura 27 ilustra o experimento de injeção de corante realizado em linhagens macrofágicas J774-G8. As células controle, de acordo com a figura 27 A *e* B*,* encontram-se acopladas, e quando tratadas com fatores pró-imuno inflamatórios isolados permanecem com o grau de acoplamento celular semelhante, como pode ser observado nas figuras 27C, 27D, 27E e 27F. No entanto, após o tratamento com os fatores de forma conjugada (TNF-α + IFN-

γ), podemos observar uma ordem crescente de células acopladas à célula injetada, como demonstrado nas micrografias representadas pelas figuras 27 G e H, corroborando com a análise gráfica demonstrada anteriormente.

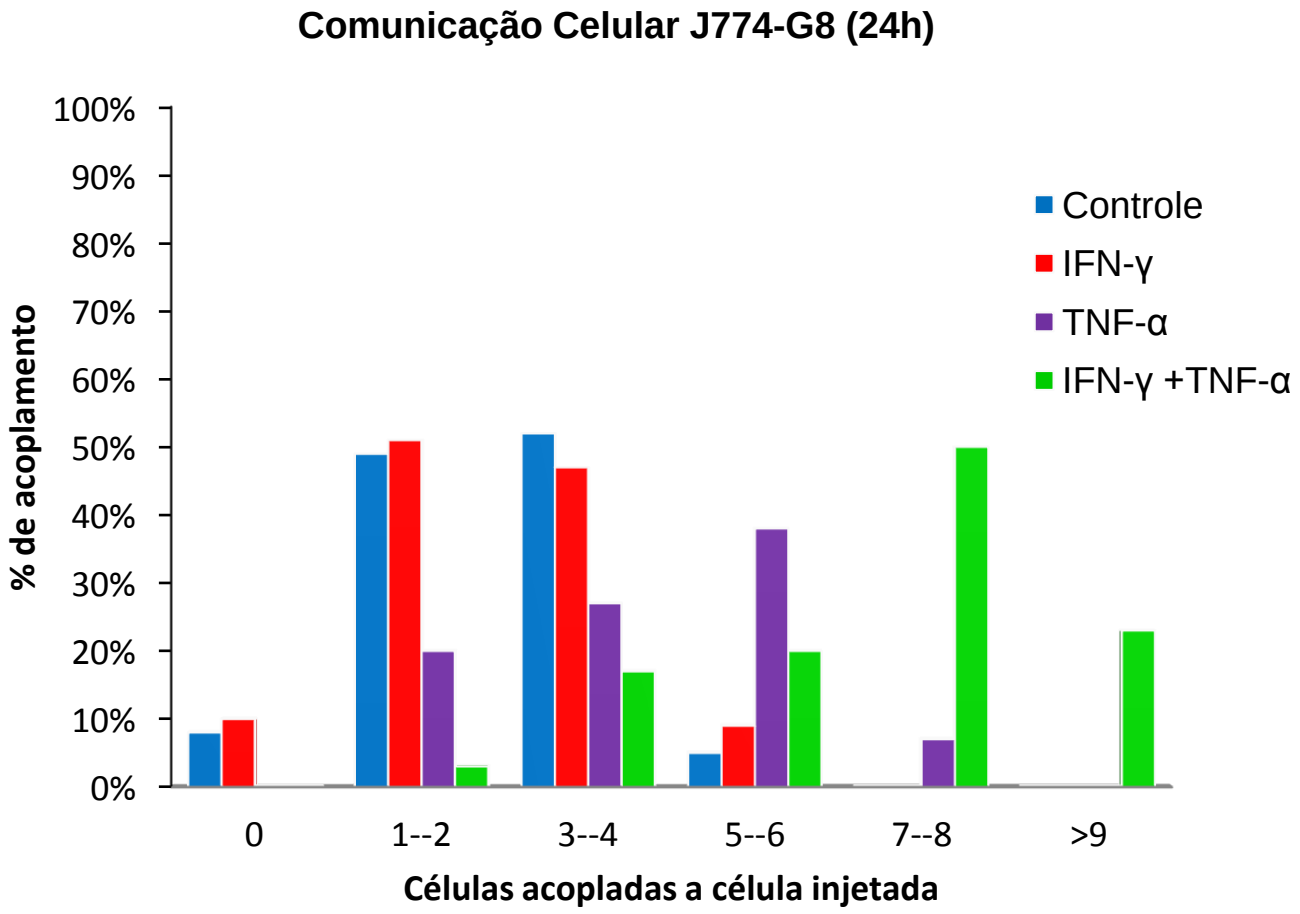


FIGURA 24: O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 controle ou incubadas por 24 horas com IFN-γ, TNF-α ou TNF-α + IFN-γ, injetadas com o corante "Lucifer Yellow". As culturas foram injetadas com o corante fluorescente "Lucifer yellow". O grau de acoplamento foi quantificado em seis classes: (0) nenhuma célula acoplada à célula injetada; (1---2) 1 à 2 células acopladas à célula injetada com o corante; (3---4) de 3 à 4 células acopladas à célula injetada; (5---6) 5 à 6 células acopladas à célula injetada; (7---8) 7 à 8 células acopladas à célula injetada; (**>9**) células acopladas à célula injetada. Um total de 90 células J774-G8 em cada uma das condições foi injetado, e mais de 20% das células tratadas injetadas incubadas TNF-α + IFN-γ estavam acopladas a mais de 10 células. Estatisticamente *p<0,05* por X^2.

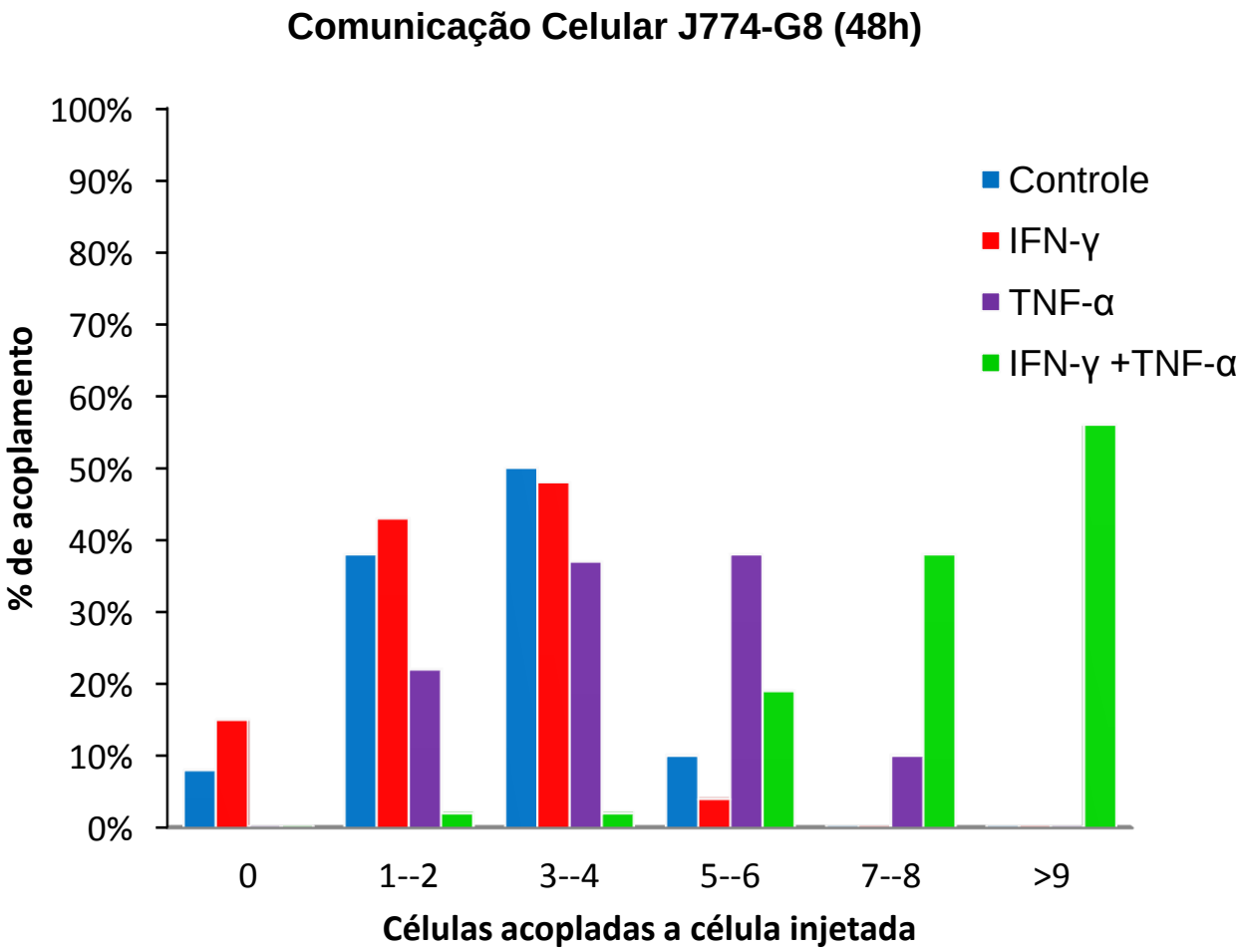


FIGURA 25: O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 controle ou incubadas por 48 horas com IFN-γ, TNF-α ou TNF-α + IFN-γ, injetadas com o corante "Lucifer Yellow". As culturas foram injetadas com o corante fluorescente "Lucifer yellow". O grau de acoplamento foi quantificado em seis classes: (0) nenhuma célula acoplada à célula injetada; (1---2) 1 à 2 células acopladas à célula injetada com o corante; (3---4) de 3 à 4 células acopladas à célula injetada; (5---6) 5 à 6 células acopladas à célula injetada; (7---8) 7 à 8 células acopladas à célula injetada; (**>9**) células acopladas à célula injetada. Um total de 90 células J774-G8 em cada uma das condições foi injetado, e mais de 50% das células tratadas injetadas incubadas TNF-α + IFN-γ estavam acopladas a mais de 10 células. Estatisticamente $p<0,05$ por X^2.

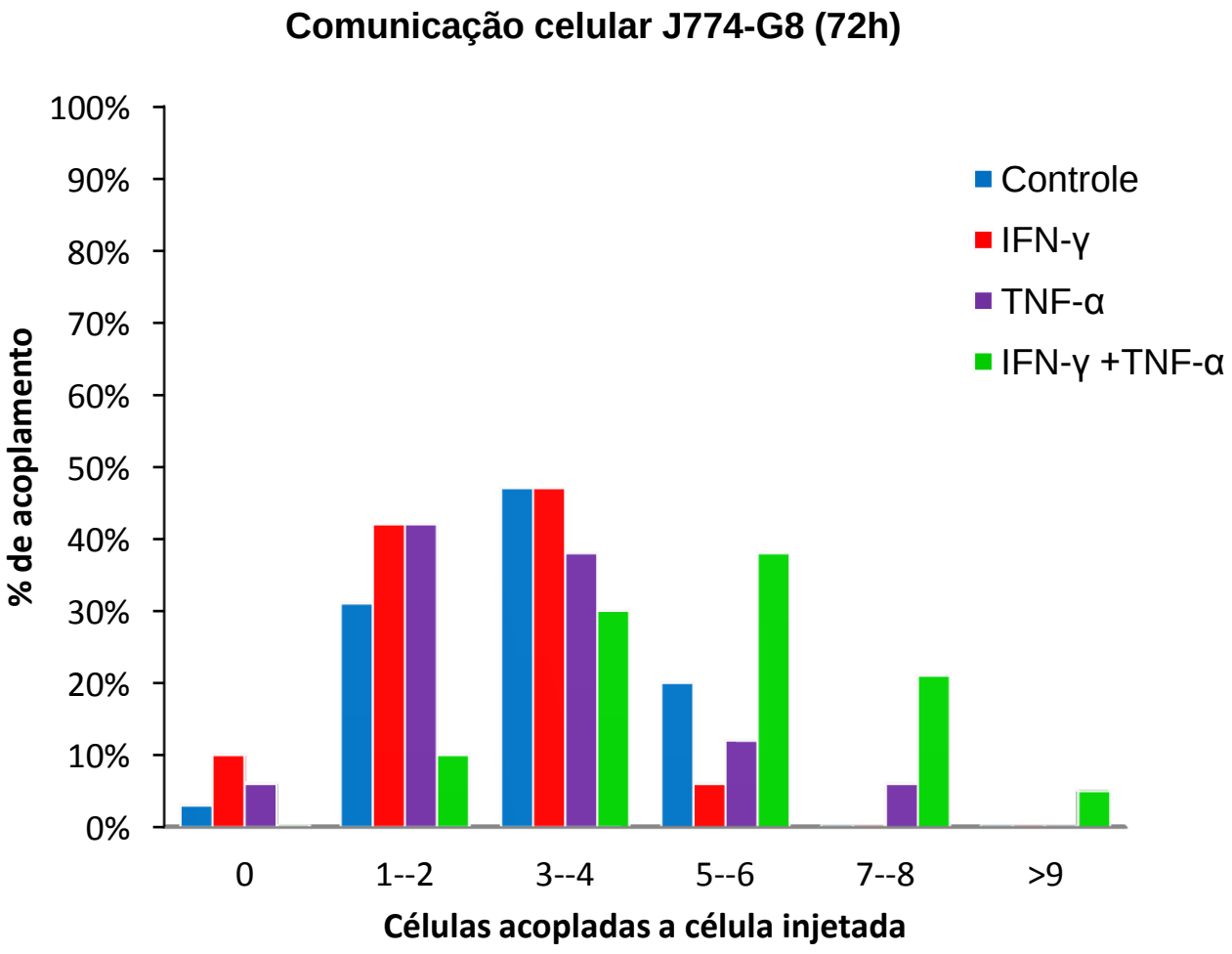


FIGURA 26: O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 controle ou incubadas por 48 horas com IFN-γ, TNF-α ou TNF-α + IFN-γ, injetadas com o corante "Lucifer Yellow". As culturas foram injetadas com o corante fluorescente "Lucifer yellow". O grau de acoplamento foi quantificado em seis classes: (0) nenhuma célula acoplada à célula injetada; (1---2) 1 à 2 células acopladas à célula injetada com o corante; (3---4) de 3 à 4 células acopladas à célula injetada; (5---6) 5 à 6 células acopladas à célula injetada; (7---8) 7 à 8 células acopladas à célula injetada; (**>9**) células acopladas à célula injetada. Um total de 90 células J774-G8 em cada uma das condições foi injetado, e menos de 40% das células tratadas injetadas incubadas TNF-α + IFN-γ estavam acopladas a mais de ente 5 e 6 células. Estatisticamente *p<0,05* por X^2.

Injeção de Corante

Célula J774-G8

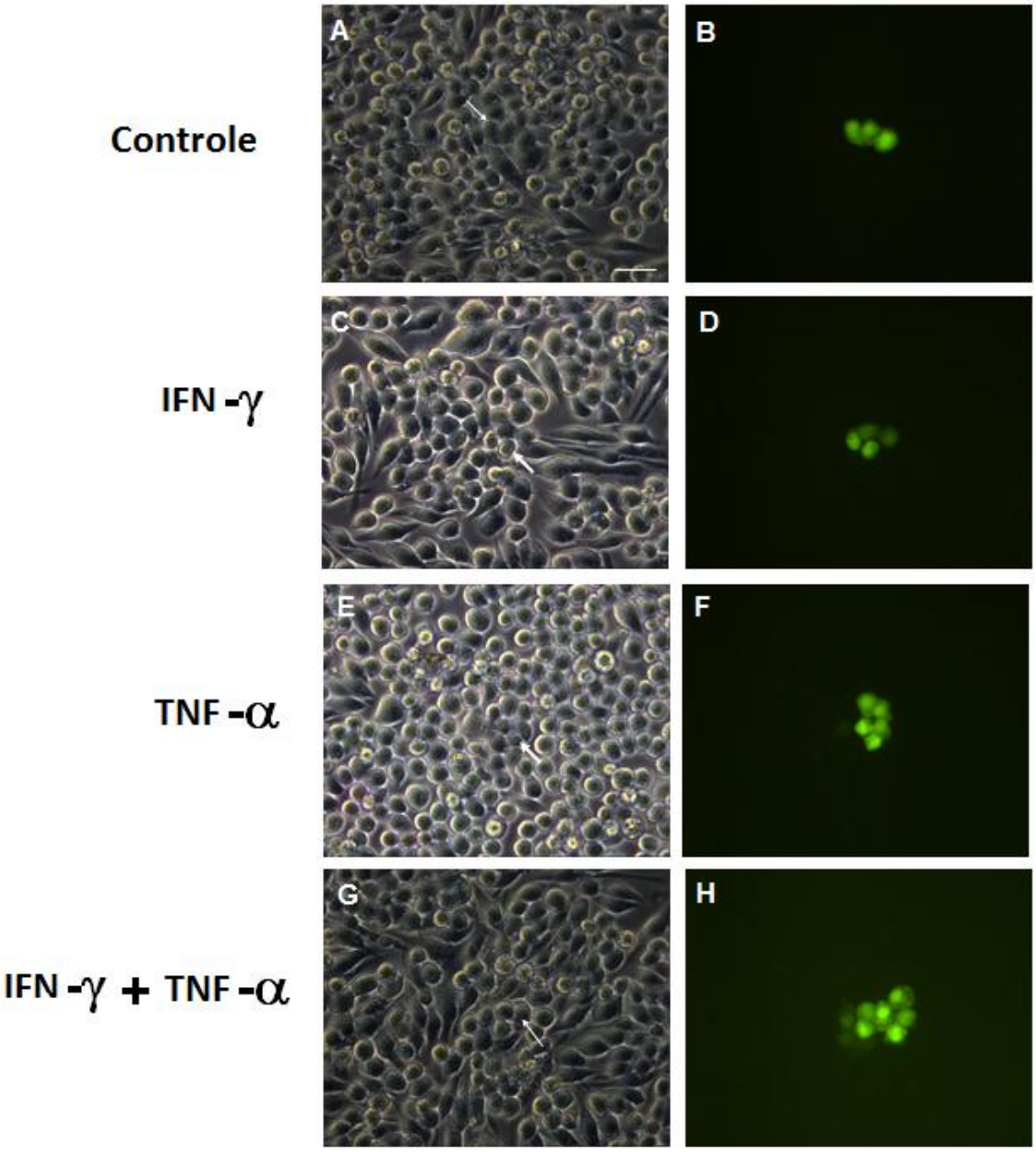


Figura 27*:* Micrografias de contraste de fase à esquerda (A, C, E e G) e fluorescência à direita (B, D, F e H) de culturas da linhagem celular macrofágica J774-G8 controle ou incubadas IFN-γ, TNF-α ou TNF-α + IFN-γ, injetadas com o corante "Lucifer Yellow". Podemos observar que as células incubadas com os fatores de forma combinada (TNF-α + IFN-γ) apresentam um grau de acoplamento maior do que o observado nas células controle ou tratadas com os fatores de forma isolada. As setas denotam a célula injetada. Barra de Calibração: 50μm. Total de experimentos: 3

4.3. INFECÇÃO COM O *T. gondii*: CRESCIMENTO CELULAR E ASPECTOS MORFOLÓGICOS

A linhagem macrofágica J774-G8 foi infectada na proporção de 10 parasitas por célula a fim de analisar como o perfil de comunicação juncional é alterado no microambiente de infecção aguda gerado pelo parasita *T. gondii* durante 24, 48 e 72 horas. Neste é possível observar as mudanças celulares que ocorrem no processo de infecção, envolvendo a manutenção da sobrevida do parasita no meio intracelular, comparadas com as células controle (sem parasita).

A figura 28 mostra micrografias de contraste de fase do processo de infecção das células J774-G8 no tempo de 24, 48 e 72 horas em culturas do grupo controle (figura 28 A1, B1 e C1) e infectado (figura 28 A2, B2 e C2). Com o decorrer do tempo podemos observar os danos crescentes causados pelo aumento da parasitemia e interação parasito-célula, provocando uma sensível diminuição na quantidade de células viáveis. Todas as micrografias foram realizadas em aumentos de 100X (objetiva de 10X), com o objetivo de apresentar um panorama dos danos gerais da cultura.

Com base nos resultados obtidos, observamos que houve alterações em todos os horários de incubação, com a formação de grumos celulares e o desprendimento das células da garrafa de cultivo, levando a diminuição do número de células em cultura e o aumento na quantidade de parasitas livres pela lise celular. Durante a interação, no período de 72 horas, foi observado o maior dano quando comparado ao outros horários de interação (24 e 48 horas) e ao controle, pois as células infectadas foram lisadas pelo parasita aumentando assim a quantidade deste livre em cultura.

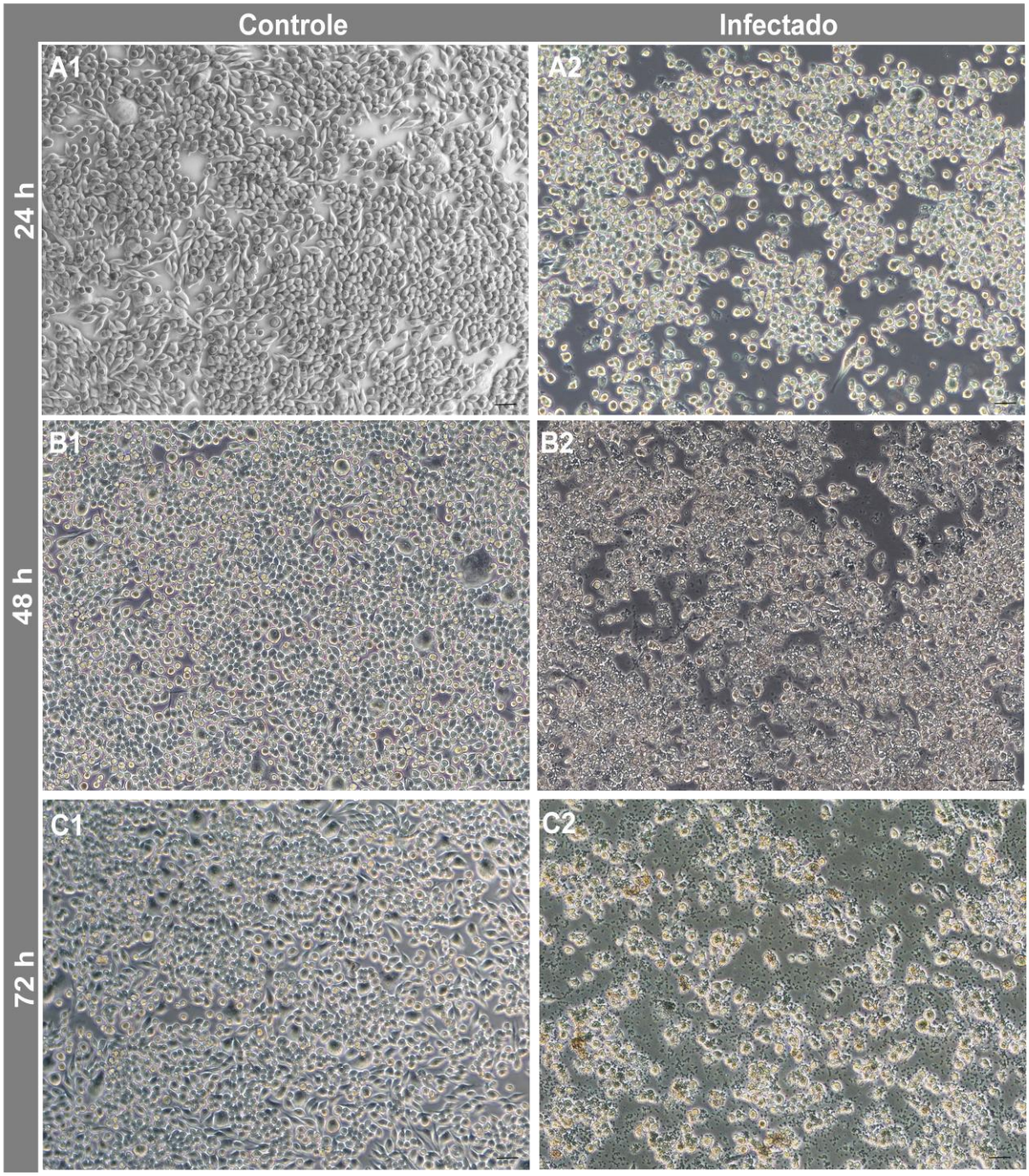


Figura 28: Micrografias em microscopia óptica (contraste de fase) utilizando células da Linhagem Macrofágica J774–G8 controle (número 1) e infectadas com *T. gondii* na proporção de dez parasitas por célula (número 2). Nos horários de 24, 48 e 72 horas (respectivamente A, B e C) é possível observar a alteração do comportamento das células infectadas em relação a sua ocupação do microambiente, estando em grumos (no fundo da garrafa ou no sobrenadante) ou se desprendendo da garrafa de cultivo (A2, B2 e C2), quando comparadas com as células controle. Barra de calibração 20µm. Aumentos de 100X (Objetiva de 10X).

Na figura 29 as micrografias de contraste de fase mostram os aspectos morfológicos das células J774-G8 nos grupos controle (figura 29 A1, B1 e C1) e infectado (figura 29 A2, B2 e C2), após a interação parasito-célula por 24, 48 e 72 horas. Comparando os grupos controle e tratado, observamos que houve alterações morfológicas nas células nos tempos avaliados (24, 48 e 72 horas), sendo possível observar o desprendimento celular, a alteração na forma celular, formação de poucos grupos celulares e o aumento da quantidade de parasitas livres na cultura com mais detalhes. Foram utilizados aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

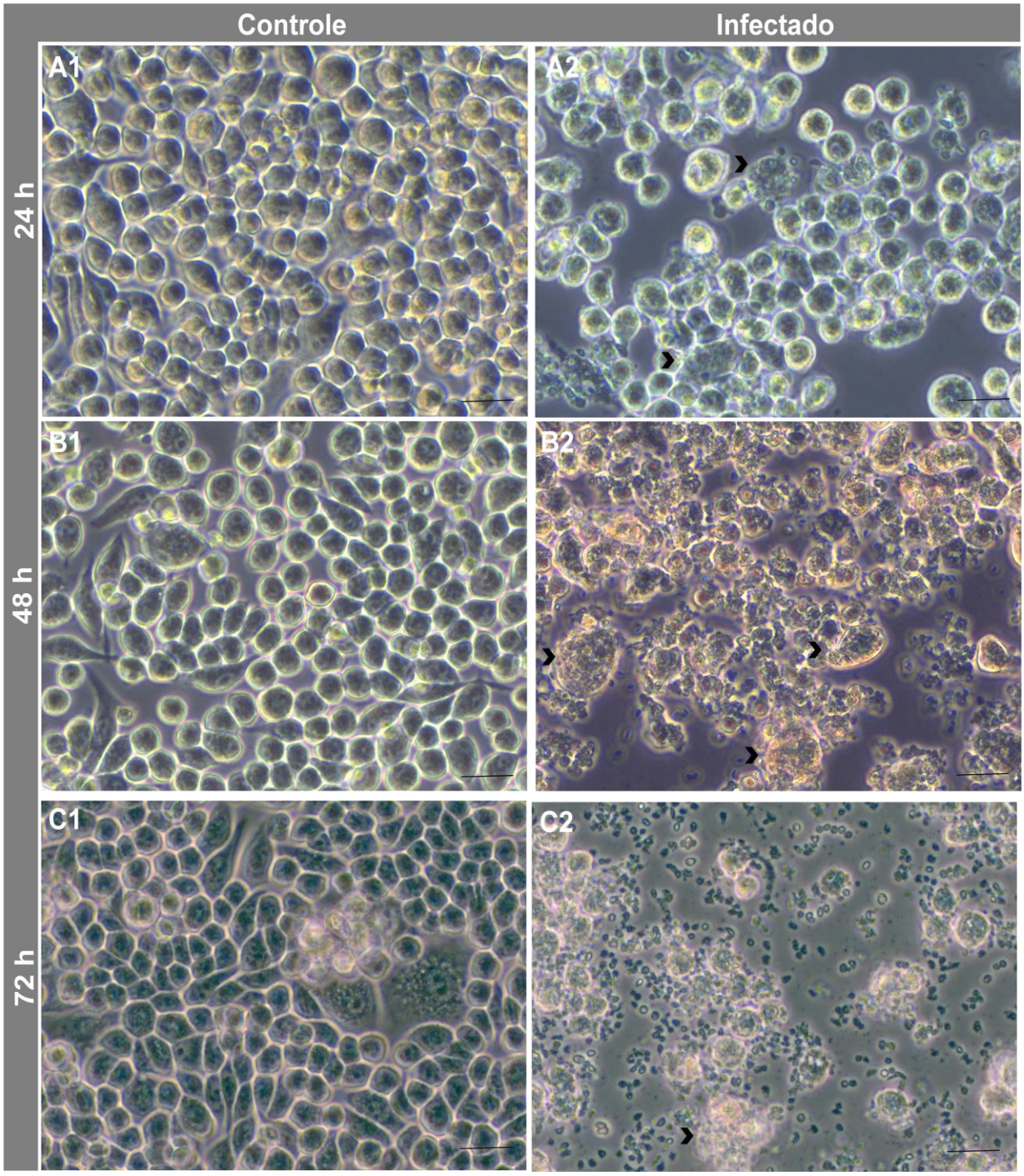


Figura 29: Micrografias em microscopia óptica (contraste de fase) utilizando células da Linhagem Macrofágica J774–G8 controle (número 1) e infectadas com *T. gondii* na proporção de dez parasitas por célula (número 2). Nos horários de 24, 48 e 72 horas (respectivamente A, B e C). Alterações morfológicas nas células J774-G8 são evidentes, como pode ser observado nas fotos A2, B2 e C2 (ponta de seta dando destaque). Com o aumento do tempo de infecção a quantidade de parasitas aumentou o que pode explicar o dano celular e a morte de células. Barra de calibração 20µm. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

4.4. INFECÇÃO COM O *T. gondii*: LOCALIZAÇÃO DA CONEXINA 43 E INTERAÇÃO COM O CITOESQUELETO

A fim de avaliar o posicionamento da proteína Conexina 43 (Cx43) em macrófagos de linhagem J774-G8, foram realizados experimentos de imunofluorescência (figura 30). Foi feita a marcação simultânea das células com os anticorpos anti-conexina 43 e Faloidina, que se liga a filamentos de F-actina, bem como a incubação com o corante DAPI, que marca o núcleo celular.

Ao analisar o experimento no sistema de microscopia confocal LSM710 Quasar, podemos observar a marcação do núcleo das células com DAPI (figura 30 A). Os resultados da figura 30B indicaram a localização da Cx43 essencialmente na membrana plasmática das células J774-G8, que se o que corrobora os dados de acoplamento dos experimentos de injeção de corantes em células controle.

Paralelamente, foi feita a imunomarcação das células com a Faloidina (anti-F-actina), demonstrando que os filamentos de actina estão distribuídos de forma homogênea pelas células J774-G8, sendo observados principalmente na membrana plasmática (figura 30C). Com isso podemos observar a organização do citoesqueleto e a manutenção do arcabouço da membrana plasmática das células J774-G8, uma vez que a infecção com os parasitas pode alterar a organização celular.

Na figura 30D foi constatada a co-localização entre as duas proteínas Cx43 e Faloidina (pontos amarelos resultantes da interação colorimétrica do verde e do vermelho dos dois anticorpos), indicando que a conexina 43 está interagindo com o citoesqueleto em um possível processo de ancoramento, sendo decisivo para a formação dos canais juncionais funcionais.

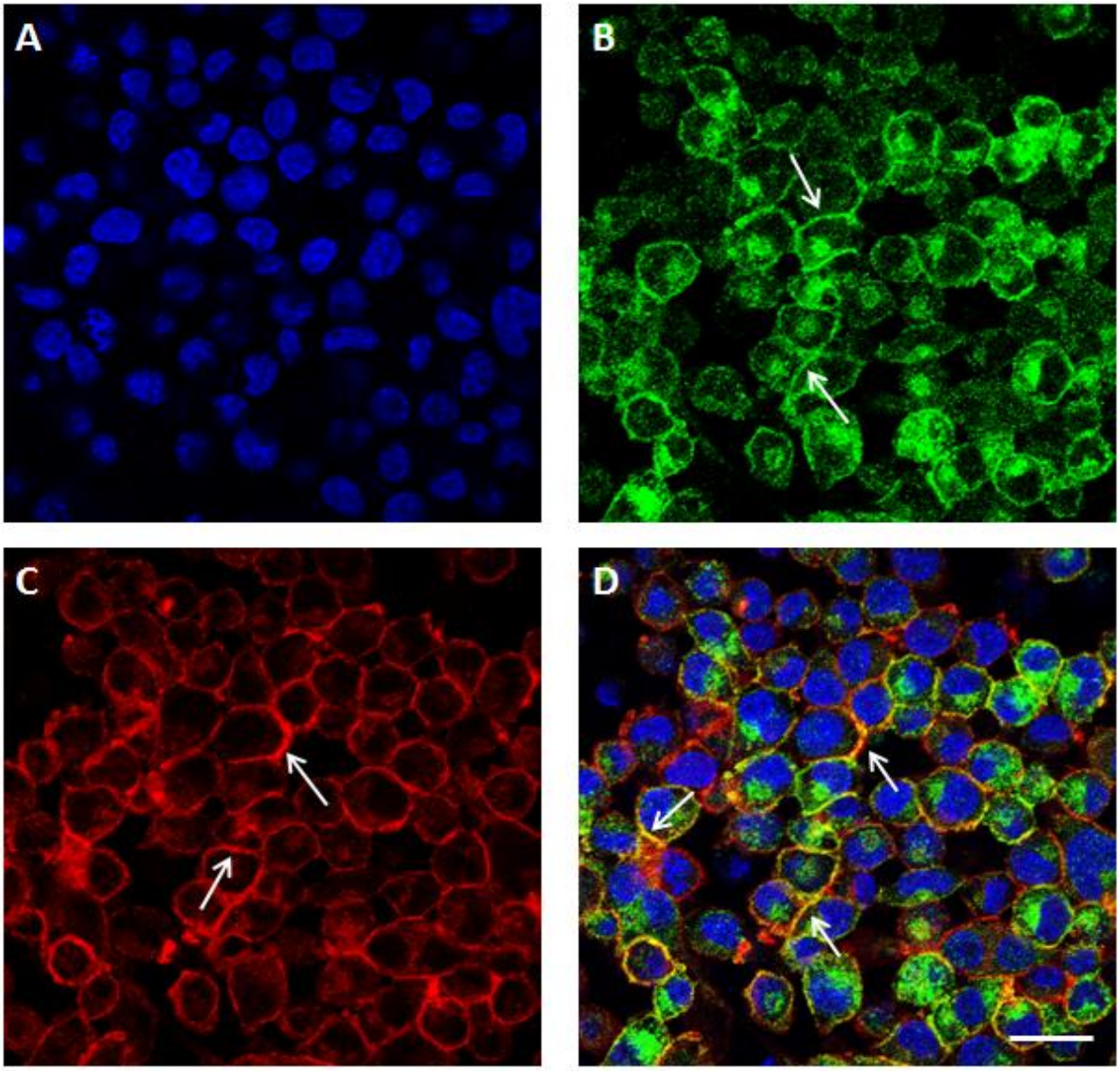


Figura 30: Imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal (LSM710, Zeiss, Germany), evidenciando a marcação para proteína Conexina43 e Faloidina (marcador de filamentos de actina) em células de linhagem macrofágica J774-G8. A marcação específica para Cx43 (verde) e Faloidina (vermelho) pode ser observada na membrana plasmática das células (B e C). Em A podemos observar o núcleo das células marcado com o corante nuclear DAPI. Na micrografia D é demonstrada a interposição de imagens, demonstrando uma possível co-localização entre as proteínas Cx43 e Actina (pontos destacados em amarelo). Barra de calibração: 50μm.

Experimentos de imunofluorescência também foram realizados em culturas de células infectadas com o parasita *T. gondii*, na proporção de dez parasitas por célula, a fim de avaliar possíveis alterações causadas pela

interação parasito-célula no complexo juncional e na estrutura celular, em 72h de infecção.

Ao analisar a figura 31A é possível observar a marcação do núcleo celular pelo DAPI em azul e a marcação do núcleo do protozoário *T. gondii* indicado pela seta. Na figura 31B podemos destacar a ausência da marcação para conexina 43, bem como a marcação para Faloidina (figura 31C) que mostra um sensível decréscimo sua presença nas células e uma possível desorganização de seu citoesqueleto, podendo então sugerir a ligação entre o citoesqueleto e a conexina 43 na linhagem macrofágica J774-G8.

Na figura 31D, consequentemente, não foi possível observar a co-localização entre as proteínas Cx43 e Faloidina como demonstrado no controle, indicando que o citoesqueleto interage com a conexina 43.

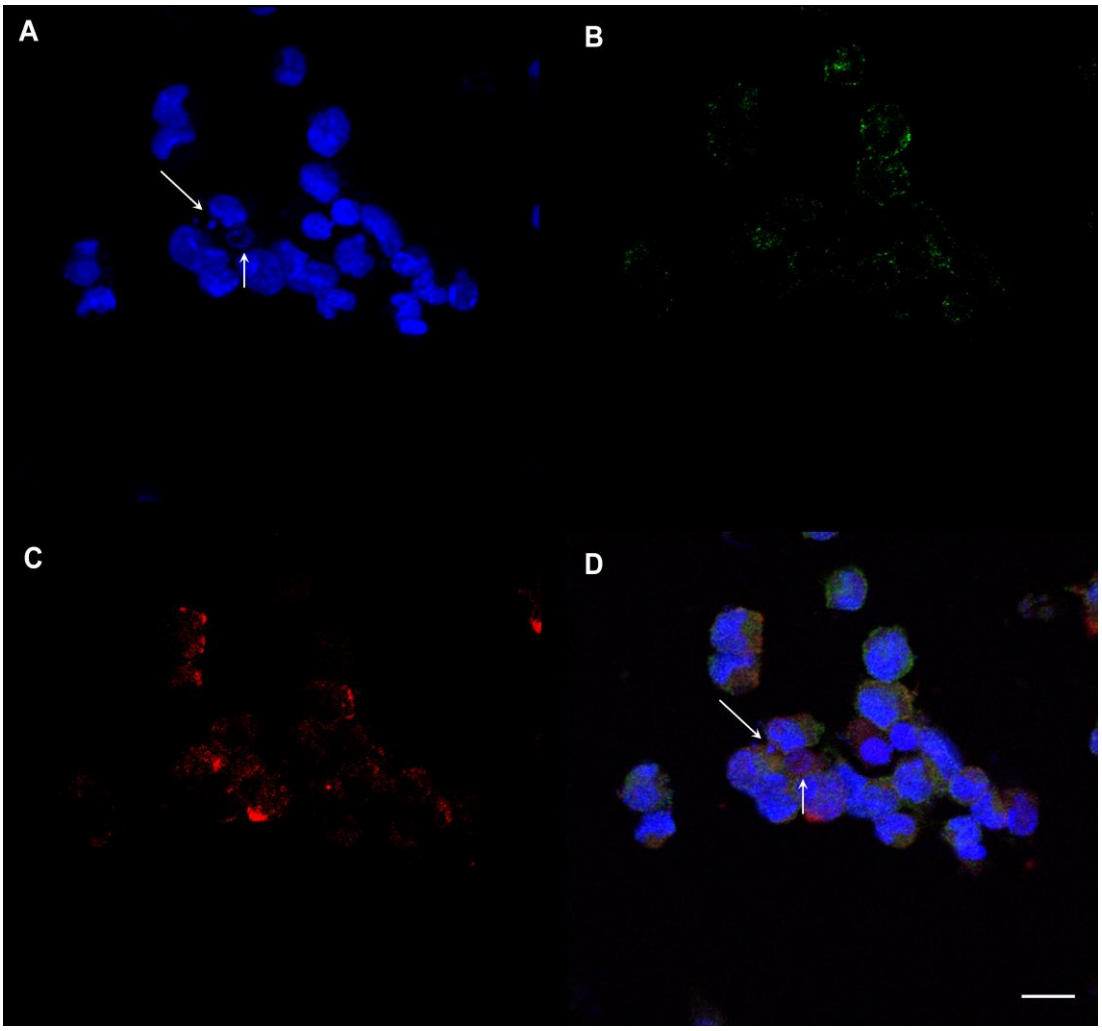


Figura 31: Imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal (LSM710, Zeiss, Germany). Nas setas apresentadas em A e D demonstra-se infecção com parasita. Nesta experiência, a marcação com Cx43 e F-actina não está presente na membrana plasmática das células J774-G8 após a infecção (B, C). Em D, a colocalização entre Cx43 e F-actina desaparece da membrana plasmática. Barra de calibração: 50µm.

4.5. INFECÇÃO COM O *T. gondii*: EXPRESSÃO DA CONEXINA 43

A expressão dos níveis proteicos da conexina43 foi analisada através de ensaios de imunoeletrotransferência utilizando células J774-G8 controle e infectadas nos horários de 24 e 48 horas. Em cada poço do gel de SDS-PAGE a 10% colocamos quantidades iguais (22,5µg) de proteína total dos extratos das células estudadas.

Observamos que a Cx43 foi expressa não só nas células controle, como também nas células infectadas em todos os tempos de incubação analisados no experimento (24 e 48 horas), como destacado na figura 32A.

Entretanto, a banda representando a interação com o parasita em um período de incubação de 24 horas apresentou uma maior expressão de Cx43 do que nas células controle (não infectadas), como pode ser observado não só na figura 32A, como também na imagem em 3 dimensões da membrana marcada com o anticorpo (figura 32B).

Os mesmos achados foram revelados em 48 horas de infecção, com a expressão da Cx43 em valores maiores que os encontrados nas células controle, no entanto com valores menores do que os encontrados em 24 horas de infecção (figuras 32A e B).

Os dados densitométricos confirmaram os achados visíveis representados na membrana marcada com o anticorpo (figura 32C).

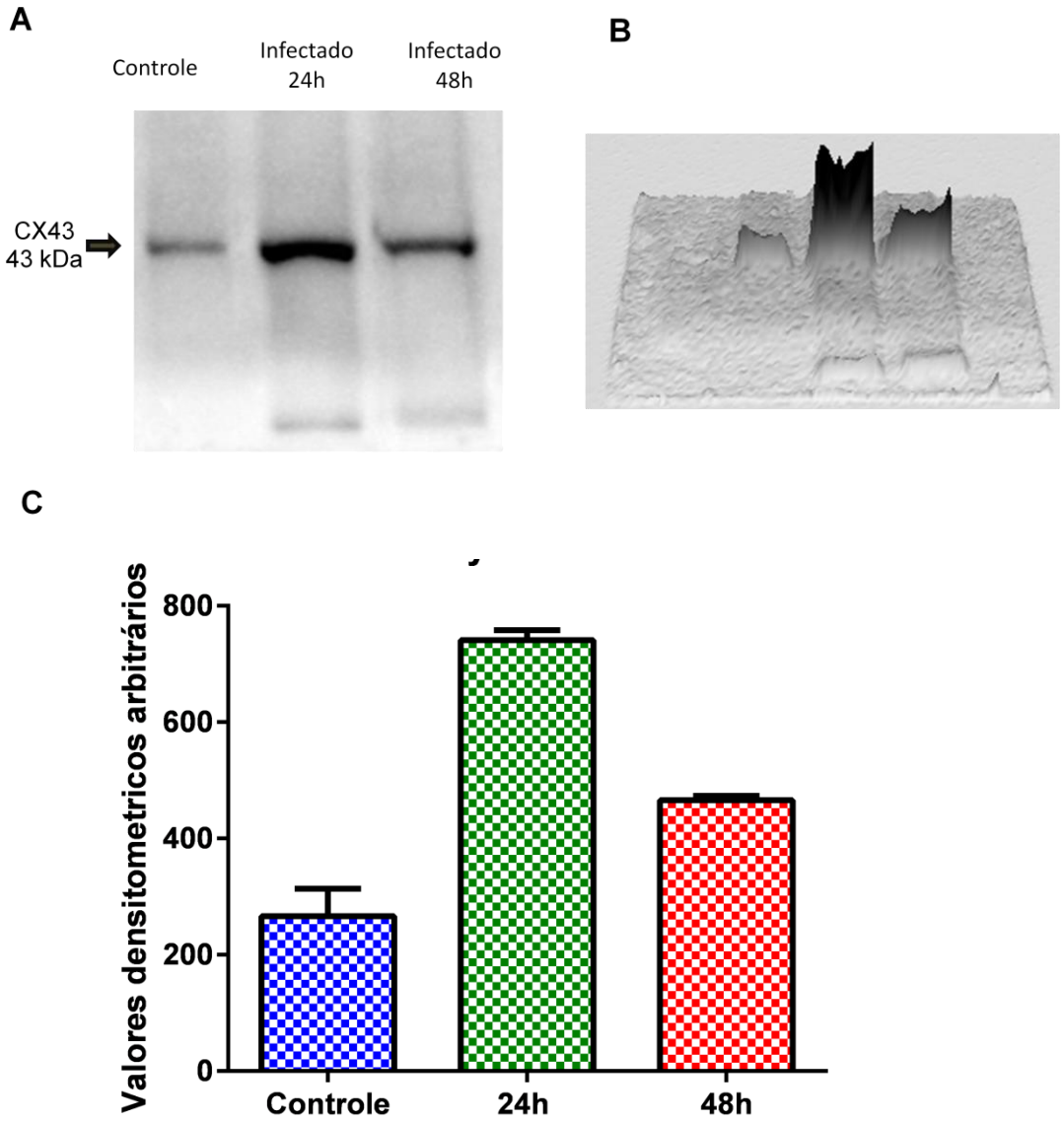


Figura 32: Em A e B, respectivamente, imagem em 2 e 3 dimensões de um dos experimentos representativos de Imunoeletrotransferência de culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 controle (não-infectada) ou infectada (período de 24 e 48 horas), respectivamente. A marcação em 43 kDa é resultado da utilização do anticorpo policlonal para a Conexina43. Quantidades iguais de proteína foram carregadas no gel SDS-PAGE à 10%. O anticorpo anti-Cx43 detectou a presença da proteína Cx43 nas células J774-G8 controle e nas J774-G8 infectadas com incubação de 24 e 48 horas. Nota-se o aumento da expressão da Cx43 em relação ao controle, nas células J774-G8 infectadas em 24 e 48 horas, no entanto é possível notar a diminuição da expressão de Cx43 se comparada ao horário de 24 horas. Em C temos o gráfico densitométrico representativo das bandas observadas na imagem do *Western blot* de culturas das células J774-G8. P<0,0001 One Way Anova. A barra indica o desvio padrão. Total de experimentos: 3.

5. DISCUSSÃO

5.1. FATORES PRÓ-IMUNE INFLAMATÓRIOS.

As junções comunicantes são formadas por uma família multigênica de proteínas transmembranares denominadas conexinas. Estes canais transmembrana permitem o tráfego de íons, segundos mensageiros e outras moléculas com até 1kDa entre células adjacentes (KOVAL *et al.,* 2015)

Fisiologicamente os canais juncionais desempenham um importante papel no desenvolvimento dos organismos multicelulares. Particularmente no sistema imune, onde a expressão da Cx43 pode modular a formação de células linfoides, como as células B e T. (MONTECINO-RODRIGUEZ *et al.,* 2000)

Hansson and Skiöldebrand (2015) afirmaram que diversas estruturas no corpo humano possuem redes de células acopladas por junções comunicantes, formadas principalmente pela Cx43. Tais células são alvo de eventos inflamatórios, que podem ser iniciados após uma lesão ou doença, e a modificação destas está associada a diversas redes de patologias do organismo (EUGENIN *et al*., 2003).

Acredita-se que em alguns tipos celulares a Cx43 é expressa em níveis basais altos e em outras não. Em astrócitos, por exemplo, a Cx43 é expressa abundantemente sob condições basais (GIAUME & MCCARTHY, 1996), entretanto GARG *et al.* (2005) demonstraram que as células microgliais em homeostase tem um baixo nível de Cx43. Em consonância, estudos apontaram que estímulos inflamatórios e a presença de moléculas da cascata inflamatória (Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α); e Interferon-γ (IFN-γ)) podem ativar células do sistema imune, como a micróglia, aumentando a expressão da Cx43 (EUGENIN *et al.,* 2001).

No entanto, o papel das conexinas em diversas situações fisiológicas e patológicas precisa de muitos esclarecimentos e estudos. Diversas doenças já estão associadas ao comportamento inadequado das conexinas, principalmente pelas formas pela Cx43 (KOVAL *et al.,* 2014), mas muitas outras patologias necessitam de explicações.

Diante deste cenário, resolvemos buscar entendimentos iniciais de como a Cx43 poderia estar sendo modulada em um ambiente em que há um estimulo inflamatório, mesmo *in vitro*.

O comportamento das células macrofágicas J774-G8 no microambiente de estimulo inflamatório foi analisado nos experimentos das figuras 17, 18 e 19, e nos demonstraram que de forma combinada (TNF-α + IFN-γ) os fatores pró-imune inflamatórios são capazes de induzir uma reorganização do arranjo das células em cultura. Este fato pode ser corroborado com o gráfico presente na figura 23, que indica uma formação abrupta de grumos celulares no tempo de 24 horas de incubação, em relação às células controle e tratadas com os fatores isolados.

Assim, esta maior formação de grumos celulares em 24 horas (figuras 17 e 23) pode nos sugerir que a organização celular em grumos deva indicar uma maior necessidade de troca de informações, uma vez que o ambiente está sendo ativado por citocinas como o TNF-α, que é importante para a ativação de macrófagos na resposta imunológica inata e consequente para aumento da capacidade celular em apresentação de antígenos aos linfócitos T $CD4^+$, que produz IFN-γ, utilizado em nossos estudos, e que irá retroalimentar a ativação macrofágica (Langston *et al.* 2017; ABBAS, 2011; ADANS & HAMILTON, 1984).

No entanto, em 48 horas de incubação com os fatores combinados foi possível observar grumos celulares com um maior número de células (figura 18), o que pode estar associado ao conjunto de ações que tentem reproduzir o processo inflamatório agudo, uma vez que é necessário manter uma constante troca de informações para que o processo inflamatório agudo consiga conter a lesão provocada pelo agente patogênico (CUZZOCREA, 2005; SELDERS *et al.,*2017)

Nas figuras 20, 21 e 22 observamos que não houve alterações morfológicas significativas das células J774-G8 em todas as possibilidades de incubação com os fatores inflamatórios, sendo possível observar a formação dos grupos celulares com mais detalhes. No entanto, conseguimos observar a formação de grumos celulares com mais células no tempo de 48 horas de incubação com TNF-α + IFN-γ (figura 21D). Este dado é corroborado por trabalhos que demonstram a ação das citocinas na ativação macrofágica, fazendo com que estas células alterem sua estrutura e capacidade de sinalização para que possa adquirir a capacidade de realizar funções

complexas de destruição e apresentação de antígenos (ADANS & HAMILTON, 1984). (SCHAIBLE *et al.,* 1999, SELDERS *et al.,*2017)

Após a etapa de análise de crescimento celular e de perfil morfológico, foram feitas as análises de injeção de corantes, a fim de avaliar funcionalmente as junções comunicantes que poderiam estar presentes em células macrofágicas.

No entanto, trabalhos relacionados à ensaios de cooperação metabólica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, não demonstraram a transferência de partículas entre culturas primárias de macrófagos peritoneais, e entre macrófagos e outros tipos celulares (Kane & Bols, 1980). No final dos anos 80 estes dados foram confirmados em experimentos de injeção intracelular do corante *Lucifer Yellow*, reforçando a ausência de acoplamento via junções comunicantes (Dean *et al.*, 1989).

Entretanto, nossos resultados demonstraram que as células de linhagem macrofágica J774-G8 apresentavam junções comunicantes funcionais quando realizadas injeções de corante, uma vez que o corante de baixo peso molecular, *Lucifer Yellow*, é transferido para as células adjacentes (figuras 27B), e corroborado estatisticamente nas figuras 24, 25 e 26 em tempos de cultura diferentes (24, 48 e 72 horas), em que mais de 90% das células está acoplada a pelo menos uma célula adjacente.

Vale ressaltar que a análise da funcionalidade das junções comunicantes foi observada por Saez *et al.* (2000) através de injeções de corante em linhagem celular macrofágica J774-A1 tratadas previamente com meio condicionado, Eugenin *et al.* (2001), ao utilizarem células da micróglia demonstraram que as junções comunicantes formadas por Cx43 estavam presentes e funcionais, porém somente quando as culturas eram incubadas com Interferon-γ (IFN-γ) + Fator de Necrose Tumoral – α (TNF-α) e IFN-Y + LPS (Lipopolissacarídeo) ativando a linhagem celular.

Este mesmo grupo relatou, em 2003, que existe comunicação funcional entre junções comunicantes mediadas por Cx43 somente em macrófagos humanos tratados com TNF-α e IFN-y, e a expressão de Cx43 foi detectada em macrófagos presentes nos locais de inflamação (EUGENIN *et al.* 2003).

No entanto, nossos resultados corroboraram com Fortes *et al* (2004), em que não é necessário o pré-tratamento com fatores inflamatórios para que se tenha a formação de junções comunicantes funcionais em células macrofágicas. Neste respectivo estudo, foram estudadas células da linhagem macrofágica J774-G8 e macrófagos peritoneais de camundongos suíços que expressaram junções comunicantes funcionais formadas pela proteína Cx43.

Porém, atualmente, conseguimos demonstrar que estas estruturas podem ter a sua atividade modulada em meio a um microambiente inflamatório, quando tratadas com fatores. Os dados demonstrados na figura 27H vão de encontro a esta modulação das junções comunicantes, uma vez que é nítido aumento da comunicação juncional, o que pode ser corroborado nos gráficos presentes nas figuras 24, 25 e 26, principalmente quando se tratando da incubação das células por 48 horas (figura 25) com o TNF-α combinado ao IFN-γ, representando um percentual de mais 50% das células injetadas acopladas com mais de 9 células. Vale ressaltar que mesmo com o pico de acoplamento ocorrendo em 48 horas de incubação, houve o aumento significativo do acoplamento juncional entre as células que passaram pela mesma incubação com fatores (TNF-α + IFN-γ), quando comparadas com o controle nos tempos de incubação de 24 e 72 horas (figuras 24 e 26).

Estes achados corroboram mais uma vez que a ativação macrofágica com os fatores combinados como, por exemplo, o IFN-γ administrado em conjunto com TNF-α provocará uma ativação macrofágica intensa (ADANS & HAMILTON, 1984). Assim, seria possível inferir que a junção comunicante, de fato, é um componente importante para a manutenção da atividade de resposta imunológica, podendo ser associado ao papel fundamental na comunicação celular já descrito da Cx43 na homeostase tecidual, na inflamação e reparação (DE MAIO *et al*, 2002; CHANSON, 2005), assim como na hematopoiese (MONTECINO-RODRIGUEZ *et al*, 2000; MadhumitaJagannathan-Bogdan and Leonard, 2013).

5.2. INFECÇÃO COM *T.gondii* x COMUNICAÇÃO CELULAR

O *T. gondii* é o agente causador da toxoplasmose. Este protozoário possui a característica de ser intracelular obrigatório, e é capaz de infectar e se

replicar em qualquer célula nucleada de animais homeotérmicos, incluindo assim os homens. (LÜDERA *et al*; 2001)

Contudo, o quadro clínico da doença no homem varia consideravelmente (DUBEY, 2008), incluindo em pacientes imunocomprometidos casos de encefalite aguda, que mata em poucos dias. Em outras vezes a evolução pode ser prolongada, sendo possível observar a toxoplasmose extracerebral (ocular, pulmonar ou cardíaca) (BOOTHROYD & BLACK, 2000). No quadro de toxoplasmose pós-natal, pode haver a adenopatia, corioretinite, hepatite, esplenite, miocardite e por vezes, meningite e encefalomielite, e dependendo da gravidade, o óbito sobrevém em uma semana (SOUZA *et al.*,2010).

Diante desta situação, diversos estudos têm sido realizados a fim de conseguir responder as ações da toxoplasmose, bem como as suas complicações. Dentre os vários sistemas envolvidos com esta doença, podemos destacar o envolvido com a comunicação juncional, uma vez que estas também ocupam um papel de destaque em estudos associados às infecções parasitárias (DE CARVALHO *et al*, 1998).

Desta forma, em nosso trabalho procuramos estudar não só as alterações relacionadas com crescimento celular e os aspectos morfológicos associados aos macrófagos (Linhagem Celular J774-G8), infectados com o *Toxoplasma gondii* como também o comportamento estrutural das junções comunicantes. Assim seria possível analisar um possível perfil de comunicação juncional em um microambiente de infecção aguda gerado pelo parasita *T. gondii*.

Em nossos resultados foi possível observar uma severa diminuição no crescimento e sobrevivência celular ao longo do processo de infecção (24, 48 e 72 horas) (figuras 28A2, B2 e C2), associada à manutenção da sobrevida do parasita no meio intracelular, quando comparadas com as células controle (não-infectadas) (figuras 28 A2, B2 e C2).

Tais modificações observadas corroboram com os achados associados à indução de alterações em vias bioquímicas e estruturais celulares promovidas pelo parasita, para que assim o mesmo consiga manter a sua sobrevida. Uma destas ações está associada à inibição da produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos peritoneais e em linhagem macrofágica J774-A1, após a infecção com *T. gondii* (SEABRA *et al.,* 2004*;* PADRÃO *et al.,* 2014), o que desativa sua

capacidade microbicida de destruição do patógeno. Lüder *et al*.(2017) demonstrou que o *T. gondii* possui a capacidade de inibir a ativação de macrófagos**.**

Em maior aumento percebemos a formação de grumos celulares e o desprendimento das células da garrafa de cultivo, associadas com alterações morfológicas causadas pelo aumento da parasitemia e consequentemente da interação parasito-célula, provocando assim a diminuição na quantidade de células viáveis em cultura (figura 29).

Estes dados podem ser justificados pela multiplicação assexuada do *T. gondii* por endodiogenia no interior da célula hospedeira, dando origem a inúmeras células-filhas (DUBEY *et al.,*1998), o que explica o aumento na parasitemia com o decorrer do tempo de infecção durante a interação no período de 72 horas (figura 29C2), onde foi observado o maior dano quando comparado ao outros horários de interação em 24 e 48 horas (figuras 29A2 e 29B2) e ao controle (figuras 29A1, 29B1 e 29C1).

Diante destes achados, e a fim de avaliar se a infecção com o *T. gondii* seria capaz de alterar a organização espacial da proteína Cx43 nas células J774-G8, realizamos experimentos de imunofluorescência (figura 30), utilizando a marcação simultânea com os anticorpos anti-Cx43 e Faloidina (anti-F Actina).

Os resultados da *figura 30B* indicaram a localização da Cx43 essencialmente na membrana plasmática das células J774-G8*,* o *que* corrobora com os nossos dados de acoplamento em experimentos de injeção de corantes (figura 27), bem como com literatura (FORTES *et al*.,2004).

Paralelamente, foi feita a imunomarcação das células com a Faloidina (anti-F-actina), demonstrando que os filamentos de actina estão distribuídos de forma homogênea pelas células J774-G8, sendo observados principalmente na membrana plasmática (*figura 30C). Estes dados estão em completa consonância com* De Souza & Benchimol (1985), no qual em células macrofágicas os filamentos de actina e microtúbulos estão espalhados pelo citoplasma das células e com forte concentração próxima à superfície celular (membrana plasmática) e estão envolvidos na mobilidade dos pseudópodes, bem como no tráfico vesicular e de organelas (ALLISON *et al.,* 1971).

Complementando os nossos achados, conseguimos demonstrar pela primeira vez na literatura a co-localização entre as proteínas Cx43 e F-actina

em células migratórias do sistema imunológico, indicando que a Cx43 está interagindo com o citoesqueleto em um possível processo de ancoramento, sendo este decisivo para a formação de canais juncionais funcionais (figura 30D).

Os hemicanais juncionais (conexons) são transportados do complexo de Golgi até a membrana plasmática da célula, através de microtúbulos, e precisam desta estrutura para que possam se inserir na membrana plasmática (Musil & Goodenough, 1993; Dhein, 1998, Gaietta *et al.*, 2002; Segretain & Falk, 2004). No entanto, até o presente momento nenhum trabalho fez esta associação em células que possuem um comportamento dinâmico, como as células macrofágicas.

Giepmans (2004) demonstrou um modelo de organização estrutural e molecular das junções celulares envolvidas com adesão e comunicação celular, esta última por intermédio de junções comunicantes formadas particularmente pela Cx43. Dentre as proteínas envolvidas neste esquema merecem destaque a α-catenina e α-actinina, estando estas envolvidas com a formação do citoesqueleto celular e inserção da conexina na membrana plasmática, como podemos observar na figura abaixo e que foi modificada da revisão de Giepmans (figura 33). De acordo com Giepmans (2004), a proteína α-catenina está presente no complexo de proteínas que estão associadas com a proteína de adesão E-caderina, que está co-localizada e co-imunoprecipitada com a Cx43. Segundo Fujimoto *et al* (1997), as α-cateninas estão co-localizadas com a Cx43 no inicio da formação da placa juncional na membrana plasmática celular, sendo essenciais para o endereçamento e inserção da conexina na membrana, como foi observado em ensaios de microscopia confocal.

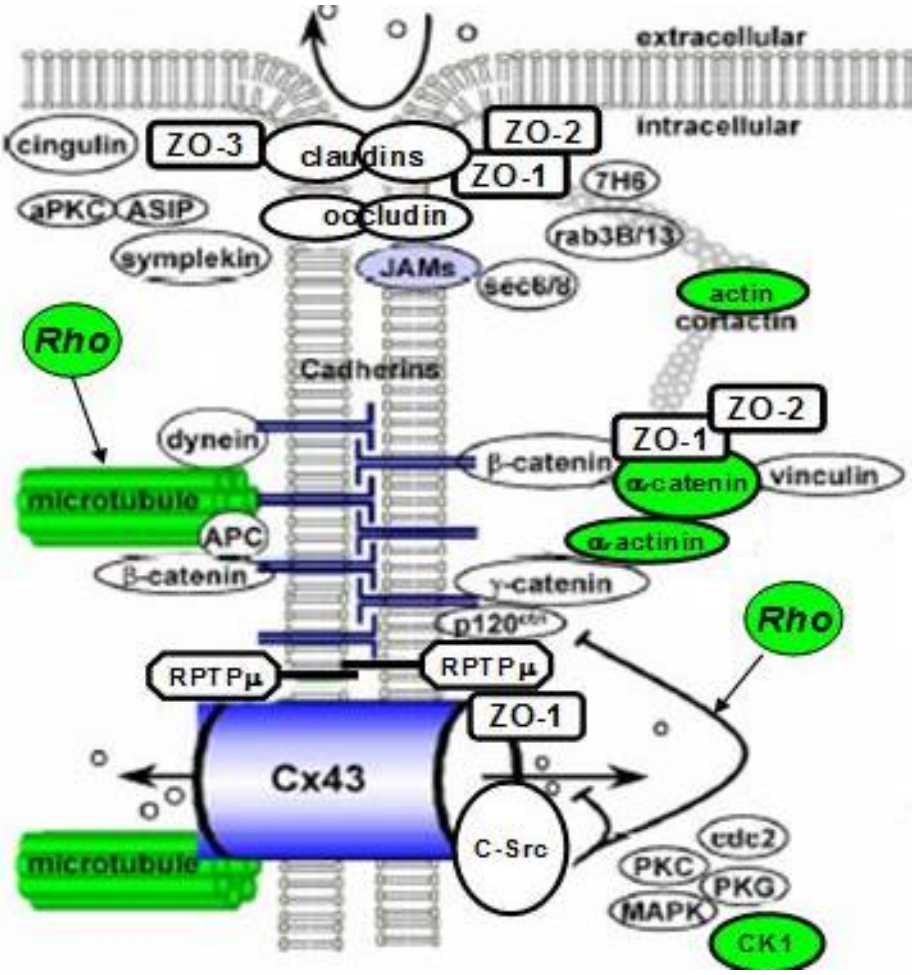


Figura 33- Esquema demonstrando as proteínas que possivelmente estão envolvidas com a inserção da Cx43 na membrana plasmática. (adaptado de Giepmans, 2004).

Os mesmos experimentos de imunofluorescência também foram realizados em culturas de células infectadas com o parasita *T. gondii*, e os resultados obtidos indicaram para uma sensível diminuição da marcação para a proteína Cx43 (figura 31B), associada com a evidente diminuição da marcação para a Faloidina (figura 31C). Tais resultados estão alinhados com De Carvalho *et al*. (1998), que demonstrou alterações estruturais em miócitos cardíacos durante a infecção *in vitro* com *T. gondii,* bem como neste mesmo estudo foi observado que o parasita é capaz de prejudicar o funcionamento da célula hospedeira através de alterações na comunicação célula-célula.

Deste modo, além de observar a diminuição da expressão da Cx43 na membrana plasmática de células macrofágicas J774-G8, foi possível observar que a infecção com os parasitas pode alterar a organização celular, como

destacado por Seabra *et al.*(2004) ao relacionar a inibição da produção de NO com a infecção por *T. gondii*, sendo capaz de despolimerizar as proteínas F-actina no processo de infecção, e desorganizar o citoesqueleto celular.

Assim, podemos indicar que o citoesqueleto interage intimamente com a Cx43 neste modelo, pelo fato da proteína Cx43 não estar presente na membrana das células infectadas da linhagem J774-G8, e que apresentam a desorganização no citoesqueleto, com a ausência da marcação para F-actina (Faloidina). Esta hipótese pode ser elucidada na figura 33, que nos demonstra a intima relação entre as proteínas de citoesqueleto na manutenção e inserção das proteínas do complexo juncional na membrana plasmática (GIEPMANS, 2004).

Ainda estudando as possíveis alterações relacionadas com a comunicação celular no modelo de infecção de células macrofágicas com o *T. gondii*, foram realizadas as análises dos níveis de expressão proteica da Cx43. Os níveis de expressão de Cx43 se mantiveram presentes nas células controle (figura 32A e 32B), o que fortalece os achados de nossos resultados de injeção de corantes e imunofluorescência (respectivamente, figuras 27 e 30).

No entanto, os níveis de expressão de Cx43 após 24 horas de infecção foram significativamente maiores do que os expressos pelas células não infectadas (figura 32A e 32B), o que foi evidenciado pela densitometria representada pela análise estatística do gráfico da figura 32C.

Processos infecto-inflamatórios desencadeiam a produção de diversas citocinas e interleucinas que são capazes de ativar diversas células do sistema imunológico, em particular os macrófagos (DE MAIO *et al*, 2002; CHANSON, 2005). Este processo de ativação pode gerar o aumento nos níveis comunicação entre as células, principalmente caso as informações necessitem ser passadas a diante, como ocorre na apresentação de antígenos para as células responsáveis pela memória imunológica (ABBAS, 2004). Esta comunicação também pode se dar por junções comunicantes, como apresentado não só por nossos achados neste trabalho, como também por outros autores (EUGENIN *et al.* 2003).

No entanto, mesmo diante de todo o processo de liberação de citocinas, é observada a alteração do arcabouço celular em casos de infecção parasitária,

com a desorganização do citoesqueleto demonstrada por nossos dados e que é corroborado por diversos autores (SEABRA *et. al*, 2004).

Desta forma, poderíamos inferir através dos dados achados nos experimentos imunoeletroforéticos (Western blot) que nas primeiras 24 horas de infecção com o *T. gondii*, há a sinalização para que o macrófago tente melhorar o seu perfil de comunicação celular, elevando a produção de Cx43 o que poderia permitir a formação de junções comunicantes eficazes no processo de infecção aguda. No entanto, os níveis de produção decrescem em 48 horas de infecção (figuras 32A, 32B e 32C), praticamente desaparecendo em 72 horas pós-infecção, como demonstrado em imunofluorescência (figura 31B), o que acompanha o desaparecimento da organização do citoesqueleto.

No entanto, é possível que em 24 horas de infecção não ocorra mais ao acoplamento funcional através das junções comunicantes formadas pela Cx43 em macrófagos, uma vez que as alterações no citoesqueleto, ligadas a despolimerização da F-actina, já se tornam evidentes após 2 horas de infecção com o *T.gondii*, em experimentos *in vitro* (SEABRA *et. al*, 2004).

Para tanto, experimentos de microscopia por imunofluorescência e injeções de corante se fazem pertinentes para que possamos de fato afirmar que a comunicação juncional nesta situação não está se fazendo presente após 24 e 48 horas de infecção com o parasita.

A partir destes achados, podemos inferir que a comunicação juncional em macrófagos pode ter um papel importante no microambiente inflamatório, uma vez que pode ser modulada por fatores que ativam a resposta imunológica inata, bem como tem a sua expressão alterada em diversos momentos da infecção parasitária, o que pode nos remeter a um papel de destaque no ambiente infecto-inflamatório.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos em nossos estudos, podemos concluir que:

6.1. As células da linhagem macrofágica J774-G8 tratadas com fatores pró-imuno inflamatórios combinados apresentaram alterações no crescimento celular, formando colônias (grumos) de células, mas não demonstraram alterações morfológicas;

6.2. As células da linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii* apresentaram não só alterações no crescimento celular, como também demonstraram alterações morfológicas, acompanhadas de morte celular;

6.3. As células de linhagem macrofágica J774-G8 tratadas com fatores pró-imuno inflamatórios combinados apresentaram sua comunicação juncional modulada positivamente;

6.4. A expressão proteica, por transferência imunoeletroforética, da Cx43 se demonstrou alterada (aumentada) em células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas por 24 e 48 horas com o parasita *Toxoplasma gondii*, quando comparadas com as células não infectadas;

6.5. As proteínas Cx43 e Faloidina interagem na membrana plasmática de linhagem macrofágica J774-G8 não infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii*, mas sofrem uma sensível redução na membrana após 72 horas de infecção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, AK; Lichtman, AH, Pillai, S. Imunologia Celular e Molecular - Rio de Janeiro: Elsevier, 7a edição. 2011.

Alves, L.A. et al. (2000) Gap junction modulation by extracellular signaling molecules: the thymus model. Braz. J. Med. Biol. Res. 33, 457–465

Aderem, A. & Underhill, DM. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Ann Rev -of Immunol* 17, 593 – 623

Alberts B, et al. (1994) Molecular Biology of the Cell (3rd ed.). New York: Garland Publishing

Balkwill, F.R. and Burke, F. (1989) The cytokine network. Immunol.Today 10, 299–304

Beyer, E. C., and T. H. Steinberg. 1991. Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. *J. Biol. Chem. 266:7971.*

Bennett, MV; Harris, LC; Bargiello, TA; Spray, DC; Hertzberg, EL & Saez, JC (1991). Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 6, 305-320.

Bennett PB , Valenzuela C , Chen LQ , Kallen RG , On the molecular nature of the lidocaine receptor of cardiac Na+ channels. Modification of block by alterations in the alpha-subunit III-IV interdomain. Circ Res. 1 de Setembro de 1995; 77 (3): 584-92.

Bennet, M.V.L. et al. (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. Trends Neurosci. 26, 610–617

Beyer, E & Steinberg TH. (1991) Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. *J. Biol. Chem.* 266, 7971-7974

Beyer, E & Steinberg TH. (1993) Connexin, gap-junction proteins, and ATP-induced pores in macrophages. *Progr Cell Res* 3, 71-74

Boehm, U; Klamp, T; Groot, M & Howard, JC (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Ann Rev of Immun* 15, 749 – 795

Bradford, MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgran quatities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54

Britz-Cunninghan, SH; Shah,MM; Zuppan, CW & Fletcher, WH. (1995) Mutations of the connexin43 gap junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *New Engl J Med* 332, 1323-29

Bruzzone, R; White, TW & Goodenough, DA. (1996-a) The cellular internet: on- line with connexins. *BioEssays* 18, n.9, 709-718

Burt JM & Spray DC. (1988) Inotropic agents modulate gap junctional conductance between cardiac myocytes. *Am J Physiol* 254 (Pt 2), H1206-10

Casey B, Ballabio A. Connexin 43 mutations in sporadic and familial defects of laterality. N Engl J Med. 1995 Oct 5; 333(14):941; author reply 941-2.

Campos de Carvalho AC, Roy C, Hertzberg EL, Tanowitz HB, Kessler JA, Weiss LM, Wittner M, Dermietzel R, Gao Y, Spray DC. 1998. Gap Junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as a consequence of protozoan infection. Brain Res. 20; 790 (1-2): 304-14.

Chanson, M. (2005) Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. Biochim. Biophys. Acta 1711, 197–207

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nature Reviews Immunology, v. 10, p. 826- 837, 2010

Contreras, J.E.[1], Sánchez HA, Véliz LP, Bukauskas FF, Bennett MV, Sáez JC (2004) Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. Brain Res. Brain Res. Rev. 47, 290–303

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002; 420:860–867.

Cotran, RS.; Kumar, V.; Robbins, S. Robbins Pathologic Basis of Disease. Schoen, FJ., editor. W. B. Saunders Company; Philadelphia: 1994. p. 1255-1259.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. Pharmacological Research, v. 52, p. 72-82, 2005.

Das Sarma J, Meyer RA, Wang F, Abraham V, Lo CW, Koval M (2001). Multimeric connexin interactions prior to the trans-Golgi network. J Cell Sci. 114 (Pt 22):4013-24.

Davis, D.M. (2007) Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. Nat. Rev. Immunol. 7, 238–243

Campos De Carvalho, A.C., Tanowitz, H.B., Wittner, M., Dermietzel, R., Roy, C., Hertzberg, E.L., et al., 1992. Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with Trypanosoma cruzi. Circ. Res. 70, 733–742.

Campos de Carvalho AC[1], Roy C, Hertzberg EL, Tanowitz HB, Kessler JA, Weiss LM, Wittner M, Dermietzel R, Gao Y, Spray DC. 1998. Gap junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as
A consequence of protozoaninfection. Brain Res. 790(1-2):304-14.

Delmar, M; Stergiopoulos, K; Homma, N; Calero G; Morley, G; Ek-Victorin, JF & Taffet, SM. (2000) A molecular model for the chemical regulation of connexin43 channels: The “Ball-and-Chain) Hypothesis. Gap junctions: Molecular basis of cell communication in health and disease (Edited by Camillo Peracchia) – Current Topics in Membranes 49, Chapter 11, 223-248

De Maio, A. et al. (2002) Gap junctions, homeostasis, and injury. J. Cell. Physiol. 191, 269–282

Dermietzel, R & Spray, DC. (1993) Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? Trends Neurosci. 16, 186 –192

Dean, C., Pichersky, E., and Dunsmuir, P. (1989). Structure, evolution and regulation of rbcSgenes in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 40, 415-439.

Dhein, S. (1998). Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. Trends Pharmacol. Sci. 19, 229-241.

DUBEY, J. P., LAGO, E. G., GENNARI, S.M., SU, C. and JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. Parasitology, p. 1 of 50, 2012

DUBEY, J. P. The History of Toxoplasma gondii—The First 100 Years. Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 6, n. 55, p. 467–475, 2008.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clinical Microbiology Review, v.11, n.2, p.267-99, 1998.

Dubey JP., Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of Toxoplasma cysts. Journal of Protozoology ,23, 4, 537, 1976.

Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Darde ML, Cohen R, Dumetre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. J Infect Dis. 2009;199:280–285.

Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. Toxoplasma gondii: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. Trends Parasitol 2010; 26(4): 190-196.

Eugenin, E.A; Eckardt, D; Theis, M; Willecke, K; Bennett, MVL & Saéz, JC. (2001) Microglia at brain stab wounds express connexin and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon-γ and tumor necrosis factor-α. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4190-4195

Eugenin EA, Branes MC, Berman JW & Saez JC (2003). TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/ macrophages that enhance physiological responses. *J Immunol.* 170(3): 1320-8.

Evans WH & Martin PE (2002) Gap junctions: structure and function (Review). Mol Membr Biol. 19(2):121-36.

Ferguson, D. J. P., A. Birch-Andersen, J. C. Siim, and W. M. Hutchison.

1978. Observations on the ultrastructure of the sporocyst and the initiation of sporozoite formation in Toxoplasma gondii. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 86:165–167.

FERREIRA-DA-SILVA, M. F.; BARBOSA, H. S.; GROSS U.; LÜDER, C. G. Stress-related and spontaneous stage differentiation of Toxoplasma gondii. Molecular Biosystems. n.4, p.824-834,2008

Flagg-Newton, J., Simponson, I. & Loewenstein, W.R. (1979). Permeability of the cell-to-cell membrane channels in mammalian cell junctions. *Science* 205, 404.

Friedl, P. et al. (2005) Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. Nat. Rev. Immunol. 5, 532–545

Fortes, F.S.A., Pecora IL, Persechini PM, Hurtado S, Costa V, Coutinho-Silva R, Braga MB, Silva-Filho FC, Bisaggio RC, De Farias FP, Scemes E, De Carvalho AC & Goldenberg RC (2004). Modulation of intercellular communication in macrophages: possible interactions between Gap junctions and P2 receptors*. J Cell Sci.* 117(Pt 20): 4717-26.

Fujimoto, J., Sawamoto, K., Okabe, M., Okano, H., Yamamoto, T. (1997). Molecular cloning and characterization of focal adhesion kinase of Drosophila melanogaster. Mol. Biol. Cell 8(Suppl.): 399a.

Furshpan, E.J. & Potter, D.D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol.* 154, 289.

Gaietta, G; Deerinck, TJ; Adams, SR; Bouwer, J; Tour, O; Laird, DW; Sosinsky, GE; Tsien, RY & Ellisman, MH. (2002) *Science* 96, 503-507

Gilula, N.B., Reeves, O.R. & Steinbach, A. (1972). Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. *Nature* 235, 262.

Gimlich, RL; Kumar, NM & Gilula, NB (1990). Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J. Cell. Biol.* 110, 597-605.

Giepmans BN[1]. Gap junctions and connexin-interacting proteins. Cardiovasc Res. 2004 May 1;62(2):233-45.

Goodenough, DA (1992) The crystalline lens: a system networked by gap junction intercellular communication. *Sem Cell Biol* 49-58

Goodenough, D. A., J. A. Goliger, and D. L. Paul. 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem. 65:475.*

Goodenough D.A. and Paul D.L. Gap Junctions; Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009 Jul; 1(1): a002576.

Gong, X.; Li, E; Klier, G; Huang, Q; Wu, Y; Lei, H; Kumar, NM; Horwitz, J & Gilula, NB. (1997) Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell* 91, 833-43

Green, CR & Severs, NJ (1993). Distribution and role of gap junctions in normal myocardium and human ischaemic heart disease. *Histochemistry* 99 105-120.

Gros, DB; Nicholson, BJ & Revel, JP (1983). Comparative analysis of gap junction protein from rat heart and liver: is there a tissue specificity of gap junctions? *Cell* 35, 539.

GUIMARÃES, E. V.; DE CARVALHO, L.; BARBOSA, H. S. Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of Toxoplasma gondii cystogenesis. International Journal for Parasitology, v.94, p.72-83, 2008.

Handel, A.; Yates, A.; Pilyugin, S.S.; Antia, R.; Gap junction-mediated antigen transport in immune responses. Trends Immunol. 2007 Nov; 28 (11): 463-6. Epub 2007 Oct 24.

Hansson and Skiöldebrand. Coupled cell networks are target cells of inflammation, which can spread between different body organs and develop into systemic chronic inflammation. Journal of Inflammation (2015)

Hehl, A.B.; Basso, W.U; Lippuner, C.; Asexual expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes. BMC Genomics. V.16, n66, p.1-16, 2015.

Herve, JC; Bourmeyster N & Sarrouilhe D (2004). Diversity in protein–protein interactions of connexins: emerging roles. *Biochim Biophys Acta.*1662 (1–2), 22– 41

Herve, JC (2005). The Connexins. *Biochim Biophys Acta.* 1711, 97 – 98.

Hide, G.; Role of vertical transmission of Toxoplasma gondii in prevalence of infection - EXPERT REVIEW OF ANTI-INFECTIVE THERAPY, 2016 VOL. 14, NO. 3, 335–344

HILL, D. AND DUBEY, J. P. Oxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. Europan Society of Clinical Microbiology and Infectius diseases. v. 8, p. 634-640, 2002

Jawetz, E; Melnick, JL; Adelberg, EA; Brooks, GF; Butel, JS & Morse, SA. (1995) Microbiologia Médica - Ed. Guanabara Koogan, 20a edição, RJ

John SA, Revel JP (1991). Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43. *Biochem Biophys Res Commun.* 178(3):1312-8

Jones, J.L.; Dargelas, V; Roberts , J.; Press, C.; Remington, J. S.; Montoya, J. G., 2009, Risk Factors for Toxoplasma gondii infection in the United States. Clin. Infect. Dis. 49, 878–884

Jongsma, HJ; Wilders, R; Takens-Kwak, BR & Rook, MB. (1993) *Gap junctions: Progress in Cell Research* 3, 187-192

Junqueira, LC & Carneiro, J. (1998) Histologia Básica. Ed. Guanabara Koogan, 8a edição, RJ

Kane, AB & Bols, NC. (1980) A study of metabolic cooperation with rat peritoneal macrophages. *J. Cell Physiol* 102, 385-393

Koval, .;Molina, SA.; Burt, JM. Mix and match: Investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues. FEBS Lett. 2014 ; 588(8): 1193–1204

Kumar, NM & Gilula, NB (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.

Kwak B.R, Hermans M.M, De Jonge HR, Lohmann SM, Jongsma HJ & Chanson M. (1995) Differential regulation of distinct types of gap junction channels by similar phosphorylating conditions. *Mol Biol Cell* 6, 1707-19

Laird DW, Puranam KL, Revel JP (1991) Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. Biochem J 273(Pt 1): 67–72.

LAIRD, D.W. Life cycle of connexins in health and disease. Biochem. J. (2006) 394, 527–543

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. A newly revised classification of the protozoa. J Protozool. 1980 Feb;27(1):37-58.

Langston PK, Shibata M, Horng T. Metabolism Supports Macrophage Activation. Front Immunol. 2017 Jan 31;8:61.

Levy, JA; Weiss, RM; Dirksen, ER & Rosen, MR. (1976) Possible communication between murine macrophages oriented in linear chains in tissue culture. *Exp Cell Res* 103, 375-385

Lilly, E.; Sellitto, C.; Milstone, LM.; White, TW. Connexin channels in congenital skin disorders. 2015. Seminars in Cell and Developmental Biology

Loewenstein, WR. (1966) Permeability of membrane junctions. *Ann N York Acad Sci.* 137, 441.

Loewenstein, WR. (1981) Gap junctions. *Physiol. Rev.* 61, 829-913

LÜDERA, C. G. K.; BOHNEA, W.; SOLDATI, D. Toxoplasmosis: a persisting challenge. Trends Parasitol. v.17, P. 460-3, 2001.

MacMicking, J; Xie, Q-X & Nathan, CF. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 15, 323 – 350

MadhumitaJagannathan-Bogdan and Leonard I. Zon .Hematopoiesis. Development. 2013 Jun 15; 140(12): 2463–2467.

Makowski, L., Caspar, D.L.D., Phillips, W.C. & Goodenough, D.A. (1977). Gap junction structures. II. Analysis of X-ray diffraction data. *J. Cell. Biol.* 74, 629-645.

Martin, CA; Homaidan, FR; Palaia,T; Burakoff, R & el-Sabban, ME. (1998) Gap junctional communication between murine macrophages and intestinal epithelial cell lines. *Cell Adhes Commun* 6, 437-49

Mahmoudi, S., Mamishi, S., Suo, X., Keshavarz, H., Early detection of Toxoplasma gondii infection by using a interferon gamma release assay: A review, Experimental Parasitology (2017),

Montecino-Rodriguez, E. et al. (2000) Expression of connexin 43 (cx43) is critical for normal hematopoiesis. Blood 96, 917–924

Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998; 157:1666–1680.

MURPHY, K.; TRAVARES, P.; WALPORT, M. Imunobiologia de Janeway. São Paulo: Artmed, 7ed. 2010.

Musil, L & Goodenough, DA. (1993) Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74, 1065-77.

Nihei, O.K. et al. (2003) A novel form of cellular communication among thymic epithelial cells: intercellular calcium wave propagation. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 285, C1304–C1313

Noma A & Tsuboi N. (1987) Dependence of junctional conductance on proton, calcium and magnesium ions in cardiac paired cells of guineapig. *J Physiol* 382 193-211.

Oviedo-Orta, E. et al. (2001) Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. FASEB J. 15, 768–774

Oviedo-Orta, E. (2002) Gap junction intercellular communication during lymphocyte transendothelial migration. Cell Biol. Int. 26, 253–263

Oviedo-Orta, E. and Evans, W.H. (2004) Gap junctions and connexinmediated communication in the immune system. Biochim. Biophys. Acta 1662, 102–112

Padrão, J.C., Cabral, G.R. A.; Silva, M.F.S.; Seabra, S.H.; DaMatta, R. A. Toxoplasma gondii infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. Parasitology International 63 (2014) 659–663.

Paul, D (1986). Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction proteins. *J. Cell Biol* 103, 123-134.

Peracchia, C. Chemical gating of gap junction channels Roles of calcium, pH and calmodulin, Biochimica et Biophysica Acta 1662 (2004) 61 – 80

PORTER S. B., SANDER, M. A. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. The New England Journal of Medicine, n. 23, p. 1643-1648, 1992.

Polacek, D; Lal, R; Volin, MV & Davies, PF (1993) Gap junctional communication between vascular cells. *Am. J. Pathol.* 142, 593-605

Polontchouck, L; Haefliger, JA; Ebelt, B; Schaefer, T; Stuhlmann, D; Mehlhorn, U; Kuhn-Regnier, F; De Vivie, ER & Dhein, S. (2001) Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 38, 883-891

Kane, A.B. & Bols, N.C. (1980) A study of metabolic cooperation with rat peritoneal macrophages. J. cell. Physiol. 102, 385-393.

Revel, J.P. & Karnovsky, M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of mouse heart and liver, *J. Cell. Biol.* 33, C7 – C12.

REY, L. In: Toxoplasma gondii e toxoplasmose. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.162- 206.

Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. 1999; 340:115–126.

Saéz, J.C. & Spray, D.C. (1991). Cell Functions. In: *Encyclopedia of Human Biology*, volume 2. Academic Press. Inc. – New York / USA.

Saéz, JC; Brañes, MC; Corvalán, LA; Eugenín, EA; González, H.; Martínez, AD & Palisson, F. (2000) Gap junctions in cells of the immune system: structure, regulation and possible functional roles. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 447-455

Saez, J.C. et al. (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. Physiol. Rev. 83, 1359–1400

Selders GS, Fetz AE, Radic MZ, Bowlin GL. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. Regen Biomater. 2017

Schaible, UE; Collins, HL & Kaufmann, SHE. (1999) Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv Immunol* 71, 313- 367

Seabra, S.H., de Souza, W., & DaMatta, R.A. Toxoplasma gondii partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. Exp. Parasitol. (2002), 100: 62- 70.

Segretain D & Falk MM. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta.* 1662(1-2): 3-21.

Severs NJ, Dupont E, Coppen SR, Halliday D, Inett E, Baylis D & Rothery S (2004). Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. *Biochim Biophys Acta.* 1662(1-2):138-48.

Severs, N.J., Dupont, E., Thomas, N., Kaba, R., Rothery, S., Jain, R., et al., 2006. Alterations in cardiac connexin expression in cardiomyopathies. Adv. Cardiol. 42, 228–242.

SIBLEY, L.D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. Department of Molecular Microbiology. v. 240, p 72–91, 2011.

Sohl G & Willecke K (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes*. 10(4-6): 173-80.

Sosinsky, G (*2000*) Gap junction structure: new structures and new insights. In Gap Junctions, *Peracchia* C (ed), Academic Press, San Diego, pp. 1-22.

Sosinsky, GE & Nicholson BJ (2005) Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*. 1711 (2): 99-125.

SOUSA, W., MARTINS-DUARTE, E. S., LEMGRUBER, L., ATTIAS, M., VOMMARO, R. C. Structural organization of the tachyzoite of Toxoplasma gondii. Scientia Medica, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

Spray, DC & Burt, JM (1990) Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am J Physiol* 258, 195-205

Spray, DC (1991) Transjunctional voltage dependence of gap junctions channels. In, Peracchia, C. (ed) *Gating of gap junction channel* (Boca Raton, FL: CRC Press), pp 97

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010; 140:805–820.

TIBAYRENE, M., KJELLBERG, F., ARNAUD, J., OURY, B., BRENIE`RE, S. F., DARDE´, M. L. & AYALA, F. J. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of Amerrica. v.88, p. 5129-5133, 1991.

Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M. (1999). Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science.* 283 (5405):1176-80.

Unkeless JC, Kaplan G, Plutner H & Cohn ZA (1979). Fc-receptor variants of a mouse macrophage cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(3): 1400-4

Unwin PN & Zampighi G. (1980) Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 283, 545-49

Van Veen T.A, van Rijen H.V & Jongsma H.J. (2000) Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation. *Cardiovasc Res* 46, 496-510

Veenstra, R.D. (2000) Ion permeation through connexin gap junction channels: effects on conductance and selectivity. *Gap junctions: Molecular basis of Cell Communication in Health and Disease* (Edited by Camillo Peracchia) – *Current Topics in Membranes* 49, Chapter 5, 95-130

Wang, XG & Peracchia, C. (1998) Chemical gating of heteromeric heterotypic gap junction channel. *J. Membr. Biol* 162, 169-170

Weidmann, S. (1972) The electrical constants of Purkinje Fibers. *J. Physiol. (London)* 118, 348

Weiner HL, Frenkel D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. Nature Rev. Immunol. 2006; 6:404–416.

Werner, R; Levine, E; Rabadan-Diehl, C & Dahl, G. (1989) Formation of hybrid cell-cell channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5380

White, T.H (1985) Acidification-resistent junctional conductance between pairs of ventricular myocytes dissociated from adult rat. *Am J Phys* 149, C447

White, T.W & Paul, D.L (1999) Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu Rev Physiol* 61, 283-310

White T.W & Bruzzone R (2000). Intercellular communication in the eye: clarifying the need for connexin diversity. *Brain Res Brain Res Rev.* 32(1): 130-7.

Willecke, K; Eiberger, J; Degen, D; Eckardt, A.; Romunaldi, M; Gueldenagel, UD & Sohl, G. (2001) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *V.2001* 15/11/2001.

Wong, C.W. et al. (2004) Connexins in leukocytes: shuttling messages? Cardiovasc. Res. 62, 357–367 22

Xia Y & Nawy S (2003). The gap junction blockers carbenoxolone and 18beta-glycyrrhetinic acid antagonize cone-driven light responses in the mouse retina. *Vis Neurosci.* 20(4): 429-35.

Yeager, M; Unger, VM & Falk, MM. (1998) Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels [published erratum appears in Curr Opin Struct Biol 1998 Dec; 8 (6): 810-11] *Curr Opin Struct Biol* 8, 517-24