

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



CAMILA MOURA DA SILVA

**COMUNICAÇÃO JUNCIONAL NO SISTEMA IMUNOLÓGICO: EXPRESSÃO DAS
JUNÇÕES COMUNICANTES NA INFECÇÃO COM *Trypanosoma cruzi* E NO
TRATAMENTO COM FATORES PRÓ-IMUNE INFLAMATÓRIOS.**

RIO DE JANEIRO

2017

CAMILA MOURA DA SILVA

**COMUNICAÇÃO JUNCIONAL NO SISTEMA IMUNOLÓGICO: EXPRESSÃO DAS
JUNÇÕES COMUNICANTES NA INFECÇÃO COM *Trypanosoma cruzi* E NO
TRATAMENTO COM FATORES PRÓ-IMUNE INFLAMATÓRIOS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina translacional, em parceria Uezo, Unigranrio e Inmetro, no Centro Universitário da Zona Oeste – UEZO, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biomedicina Translacional.

RIO DE JANEIRO
2017

DA SILVA, C.M

COMUNICAÇÃO JUNCIONAL NO SISTEMA IMUNOLÓGICO: EXPRESSÃO DAS JUNÇÕES COMUNICANTES NA INFECÇÃO COM *Trypanosoma cruzi* E NO TRATAMENTO COM FATORES PRÓ-IMUNE INFLAMATÓRIOS/ Camila Moura da Silva. – 2017. 97f.

Orientadores: Professor Fabio da Silva de Azevedo Fortes e Professor Sergio Henrique Seabra

Bibliografia: f. 74-97.

Dissertação de Mestrado em Biomedicina Translacional - Universidade do Grande Rio – Unigranrio, Centro Universitario da Zona Oeste – UEZO, Inmetro; Programa de Biomedicina Translacional, 2017.

1. Junções comunicantes. 2. Macrófagos 3. Conexina 43 4. *Trypanosoma Cruzii* – Rio de Janeiro. I. Orientadores Prof. Fabio da Silva de Azevedo Fortes e Professor Sergio Henrique Seabra. II. Universidade do Grande Rio – Unigranrio, Centro Universitario da Zona Oeste – UEZO, Inmetro; Programa de Biomedicina Translacional. III. COMUNICAÇÃO JUNCIONAL NO SISTEMA IMUNOLÓGICO: EXPRESSÃO DAS JUNÇÕES COMUNICANTES NA INFECÇÃO COM *Trypanosoma cruzi* E NO TRATAMENTO COM FATORES PRÓ-IMUNE INFLAMATÓRIOS.

CAMILA MOURA DA SILVA

COMUNICAÇÃO JUNCIONAL NO SISTEMA IMUNOLÓGICO: EXPRESSÃO DAS JUNÇÕES COMUNICANTES NA INFECÇÃO COM *Trypanosoma cruzi* E NO TRATAMENTO COM FATORES PRÓ-IMUNE INFLAMATÓRIOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina translacional, em parceria Uezo, Unigranrio e Inmetro, no Centro Universitário da Zona Oeste - Uezo, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biomedicina Translacional.

Aprovada em 13 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

(Prof. Emerson Lopes Olivares, Doutor, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFFRJ)

(Prof. Sergian Vianna Cardozo, Doutor, Universidade do Grande Rio -UNIGRANRIO-RJ)

(Prof. Thaís Accorsi Mendonça, Doutora, Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO-RJ)

Dedico este trabalho a todos que estiveram ao meu lado me incentivando e me ajudando a chegar ate aqui. Em especial aos meus pais e ao meu esposo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado sabedoria, paciência e forças para suportar as dificuldades encontradas pelo caminho e concluir mais essa etapa da minha vida, sem Ele nada teria sido possível.

Aos meus pais por terem acreditado em mim, por terem me ajudado a continuar mesmo diante de tantas dificuldades. Pelo amor, apoio e incentivo.

Ao meu esposo, grande amigo e companheiro que esteve ao meu lado com seu amor, carinho e paciência me incentivando e me ajudando a passar por essa mais essa etapa.

Ao meu orientador, que me presenteou com a oportunidade de fazer o mestrado, compreendeu minhas dificuldades, ajudou-me a crescer e me ensinou a viver no mundo da pesquisa, e a ser uma docente.

Aos meus colegas do Laboratório de Terapia e Fisiologia Celular e Molecular, em particular Gabriella por ter ajudado a fazer minha dissertação acontecer.

À Prof. Marlene Benchimol, que disponibilizou seu tempo para ser revisora do trabalho me ajudando com seus conselhos e críticas.

A todos aqueles que contribuíram de uma forma direta ou indireta para que este trabalho fosse realizado: Muito Obrigada!

“A principal meta da educação é criar homens que sejam capazes de fazer coisas novas, não simplesmente de repetir o que as outras gerações já fizeram. Homens que sejam criadores, inventores, descobridores. A segunda meta da educação é formar mentes que estejam em condições de criticar, verificar e não aceitar tudo o que a eles se propõe.”

Jean Piaget (1896-1980)

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS) calculam que 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo. Na infecção chagásica, o parasita é capaz de prejudicar o funcionamento das células hospedeiras através de mudanças na comunicação celular. No entanto, essas junções não estão totalmente caracterizadas em macrófagos. Seus mecanismos reguladores ainda merecem esclarecimentos, principalmente antes de mudanças patológicas, como nos processos infecciosos e inflamatórios causados por *T. cruzi*. Assim, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a modulação estrutural e funcional das junções comunicantes, formadas pela Conexina 43 em linhagens macrofágicas J774-G8 após a ativação com fatores pró-imune inflamatórios e na infecção com o *T. cruzi*. Os seguintes testes foram realizados: Imunoeletroforese (*Western Blot*) para analisamos a expressão da conexina 43. Imunofluorescência utilizando marcadores específicos para conexina 43 e F-actina; e ensaios de corante intracelular de microinjeção em células normais ativadas com Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e Interferon- γ (IFN- γ) e infectadas com o parasita em sua forma tripomastigota de cepa Y. Os resultados mostraram que células de linhagem macrofágica J774-G8 apresentam alterações significativas em seu perfil de comunicação intercelular por junções comunicantes, quando submetidas ao microambiente estimulado com fatores pró-imune inflamatórios. Experimentos de injeções intracelulares de corante em culturas previamente tratadas com IFN- γ e TNF- α de forma combinada, e em incubações de até 48h, aumentaram significativamente a comunicação mediada por junções comunicantes. E, ensaios de *western blot* mostraram que em 48h houve aumento significativo na comunicação mediada por junções comunicantes e a imunofluorescência em culturas infectadas com *T. cruzi* e em incubações de até 72h mostraram que a conexina 43 não estava presente na membrana e que, possivelmente, estaria retida no citoplasma.

Palavras-chave: Junções comunicantes, Conexina 43, Macrófagos e *Trypanosoma Cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Reports from the World Health Organization (WHO) estimate that 6 to 7 million people are infected worldwide. In chagasic infection, the parasite is able to impair the functioning of host cells through changes in cellular communication. However, these junctions are not fully characterized in macrophages. Its regulatory mechanisms still deserve clarification, especially before pathological changes, as in the infectious and inflammatory processes caused by *T. cruzi*. Thus, the main objective of this study was a structural and functional modulation of the communications, formed by Connexin 43 in J774-G8 macrophages following an activation with pro-inflammatory factors and *T. cruzi* infection. The following tests were performed: Immunoelectrophoresis (Western Blot) to analyze the expression of connexin 43; Immunofluorescence using specific markers for connexin 43 and F-actin and intracellular microinjection dye assays in normal cells activated with Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Interferon- γ (IFN- γ) and infected with the parasite in its trypomastigote form of strain Y. The results showed that lineage cells macrophages J774-G8 present significant changes in their intercellular communication profile by communicating junctions when submitted to the microenvironment stimulated with inflammatory pro-immune factors. Experiments of intracellular dye injections in cultures previously treated with IFN- γ and TNF- α combined, and in incubations of up to 48h, significantly increased the communication mediated by communicating junctions. And, western blot assays showed that in 48h there was a significant increase in the communication mediated by communicating junctions and the immunofluorescence in cultures infected with *T. cruzi* and in incubations of up to 72h showed that the connexin 43 was not present in the membrane and that, possibly, would be retained in the cytoplasm.

Key words: Gap junctions, Connexin 43, Macrophages and *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|-----------|
| FIGURA 1: <i>Trypanosoma cruzi</i> e seu vetor, o barbeiro..... | 3 |
| FIGURA 2: Mapa de prevalência estimada de Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> | 4 |
| FIGURA 3: Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 6 |
| FIGURA 4: Progressão da doença de Chagas..... | 8 |
| FIGURA 5: Esquema da organização dos canais juncionais na membrana plasmática..... | 11 |
| FIGURA 6: Tipos de conexons e canais juncionais..... | 13 |
| FIGURA 7: Representação da abertura e fechamento de canais..... | 15 |
| FIGURA 8: Modelo topológico da proteína..... | 16 |
| FIGURA 9: Representação esquemática das etapas que levam à síntese, montagem e degradação de canais de membrana de junção gap Estrutura das junções comunicantes..... | 21 |
| FIGURA 10: Esquema mostrando os parceiros de ligação conhecidos para conexinas..... | 23 |
| FIGURA 11: Representação esquemática da imunidade inata e imune adaptativa..... | 24 |
| FIGURA 12: Micrografia eletrônica de um macrófago..... | 26 |
| FIGURA 13: Desenho esquemático mostrando a ligação do fagócito à bactéria..... | 28 |
| FIGURA 14: Desenho esquemático da resposta inflamatória a agentes microbianos por fagocitose..... | 29 |
| FIGURA 15: Micrografias em contraste de fase das culturas de linhagem celular macrófaga J774-G8 24h após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Aumento de 100x..... | 42 |
| FIGURA 16: Micrografias em contraste de fase das culturas de linhagem celular macrófaga J774-G8 48h após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Aumento de 100x..... | 43 |
| FIGURA 17: Micrografias em contraste de fase das culturas de linhagem celular macrófaga J774-G8 72h após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Aumento de 100x..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| FIGURA 18: Micrografias em contraste de fase das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 24h após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Aumento de 400x..... | 45 |
| FIGURA 19: Micrografias em contraste de fase das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 48h após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Aumento de 400x..... | 46 |
| FIGURA 20: Micrografias em contraste de fase das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 72h após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Aumento de 400x..... | 47 |
| FIGURA 21: Gráfico comparativo das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios em períodos de 24, 48 e 72 horas..... | 48 |
| FIGURA 22: Injeção de corantes em culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 48h após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios..... | 50 |
| FIGURA 23: Gráfico comparativo da Injeção de corantes das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 24h após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios..... | 52 |
| FIGURA 24: Gráfico comparativo da Injeção de corantes das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 48h após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios..... | 53 |
| FIGURA 25: Gráfico comparativo da Injeção de corantes das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 72h após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios..... | 54 |
| FIGURA 26: Micrografias em contraste de fase das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 24, 48 e 72 horas após infecção com T. cruzi. Aumentos de 100X | 56 |
| FIGURA 27: Micrografias em contraste de fase das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 24, 48 e 72 horas após infecção com T. cruzi. Aumentos de 400X | 57 |
| FIGURA 28: <i>Western blot</i> das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 24, 48 e 72 horas após infecção com T. cruzi..... | 58 |

| | |
|--|-----------|
| FIGURA 29: Gráfico densitométrico das bandas de <i>Western blot</i> de culturas das células J774-G8 24, 48 e 72 horas após infecção com <i>T. cruzi</i> | 59 |
| FIGURA 30: Imunofluorescência das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 controle 24, 48 e 72..... | 61 |
| FIGURA 31: <i>Western blot</i> das culturas de linhagem celular macrofágica J774-G8 24, 48 e 72 horas após infecção com <i>T. cruzi</i> | 63 |
| FIGURA 32: Esquema indicando as proteínas que possivelmente estariam envolvidas na inserção da Cx43 na membrana plasmática..... | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| TABELA 1: Família multigênica das conexinas..... | 17 |
|---|-----------|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AC** - Alça citoplasmática
- ADP** - Adenosina difosfato
- AMPc** - Adenosina monofosfato cíclico
- APCs** - Células apresentadoras de antígenos
- BSA** - *Bovine Serum Albumin*
- CMTX** - Charcot-Marie-Tooth
- Cx** - Conexina
- DAPI** - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DMEM** - *Dulbecco's modified Eagle's medium*
- E** - Alças extracelulares
- GJCs** - Junções comunicantes
- IFN** - Interferon
- IL** - Interleucina
- IP3** - Trisfosfato de inositol
- KID** - Ceratite-ictiose-surdez
- LPS** - Lipopolissacarídeo
- MHC** - Moléculas do complexo de histocompatibilidade
- NK** - Natural killer
- NO** - Óxido nítrico
- ODDD** - Displasia Oculodentodigital
- OMS** - Organização Mundial de Saúde
- PBS** - *Phosphate buffered saline*
- RE** - Retículo endoplasmático
- ROIs** - Intermediários reativos do oxigênio
- RT-PCR** - PCR em tempo real
- TBS** - *Tris-buffered saline*
- TM** - Domínios transmembrana
- TNF** - Fator de Necrose Tumoral
- ZO** - Zonas ocludentes

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. DOENÇA DE CHAGAS..... | 3 |
| 2.1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas..... | 3 |
| 2.1.2. Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 4 |
| 2.1.3. Aspectos clínicos da Doença Chagas..... | 7 |
| 2.1.4. Interação <i>T.cruzi</i> - Célula Hospedeira..... | 8 |
| 2.2. JUNÇÕES COMUNICANTES..... | 10 |
| 2.2.1. Estrutura e Organização das Junções Comunicantes..... | 10 |
| 2.2.2. Propriedades das Junções Comunicantes..... | 13 |
| 2.2.3. Estrutura das Conexinas..... | 15 |
| 2.2.4. Funções das Conexinas..... | 17 |
| 2.2.5. Conexinas na Formação e das Junções Comunicantes..... | 19 |
| 2.3. SISTEMA IMUNOLÓGICO E INFLAMAÇÃO..... | 23 |
| 2.3.1. Macrófagos..... | 25 |
| 2.3.2. Funções e Interação Celular..... | 26 |
| 2.4. JUNÇÕES COMUNICANTES EM MACRÓFAGOS..... | 30 |
| 2.5. JUNÇÕES COMUNICANTES NA DOENÇA DE CHAGAS..... | 32 |
| 3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO..... | 34 |
| 4. OBJETIVOS..... | 35 |
| 5. MATERIAIS & MÉTODOS..... | 36 |
| 5.1. CULTURA DE CÉLULAS..... | 36 |
| 5.1.1. Células da Linhagem Macrofágica J774-G8..... | 36 |
| 5.1.2. Obtenção das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , cepa Y..... | 36 |
| 5.1.3. Tratamento com fatores pró-Imune inflamatórios..... | 37 |
| 5.2. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS..... | 37 |
| 5.3. IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA..... | 37 |
| 5.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA..... | 39 |
| 5.5. INJEÇÃO DE CORANTE..... | 40 |
| 5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 6. RESULTADOS..... | 41 |
| 6.1. TRATAMENTO COM FATORES PRÓ-IMUNE INFLAMATÓRIOS: CRESCIMENTO CELULAR E ASPECTOS MORFOLÓGICOS..... | 41 |
| 6.2. TRATAMENTO COM FATORES PRÓ-IMUNE INFLAMATÓRIOS: COMUNICAÇÃO CELULAR..... | 48 |
| 6.3. INFECÇÃO COM O <i>T. cruzi</i>: CRESCIMENTO CELULAR E ASPECTOS MORFOLÓGICOS..... | 54 |
| 6.4. INFECÇÃO COM O <i>T. cruzi</i>: EXPRESSÃO DA CONEXINA 43..... | 57 |
| 6.5. INFECÇÃO COM <i>T. cruzi</i>: LOCALIZAÇÃO DA CONEXINA 43 E INTERAÇÃO COM O CITOESQUELETO..... | 59 |
| 7. DISCUSSÃO..... | 64 |
| 7.1. FATORES PRÓ-IMUNE INFLAMATÓRIOS..... | 64 |
| 7.2. INFECÇÃO COM <i>T.cruzi</i> x COMUNICAÇÃO CELULAR..... | 67 |
| 8. CONCLUSÕES..... | 73 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 74 |

1. INTRODUÇÃO

A Tripanossomíase Americana, ou doença de Chagas, tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* que vive e se multiplica no interior das células de uma variedade de tecidos (DUMONTEIL and HERRERA, 2017). O parasito é transmitido, geralmente, através da contaminação da conjuntiva, das mucosas ou de lesões cutâneas com as fezes do hospedeiro invertebrado, espécies de hemípteros hematófagos pertencentes à família *Ruduviidae* e subfamília *Triatominae*, comumente conhecidos como “barbeiros”, como *Triatoma infestans*, *Rhodnius proxilus* e *Panstrongylus megistus* sendo os vetores mais comuns (NORMAN and LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

Esta doença acomete 6 e 7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente nas Américas, causando cerca de 12.000 mortes por ano (WHO, 2015).

Na infecção chagásica, diversos sistemas fisiológicos sofrem alterações e parte destas complicações está associada à alteração funcional das junções comunicantes 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 (SALAMEH and DHEIN, 2011). 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 et al, 2003; SAEZ et al, 2003).

A caracterização morfológica e funcional das junções comunicantes em macrófagos, em particular a conexina 43 - proteína presente neste sistema - tem sido alvo de estudo de diversos grupos, pois têm um papel-chave na homeostase dos tecidos, na inflamação e reparação (DE MAIO et al, 2002; CHANSON et al, 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. cruzi*.

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 et al (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 (HANDEL et al, 2007).

Portanto, diante deste cenário, é importante entender possíveis mecanismos que possam ser utilizados para que o processo infecto-inflamatório causado pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* seja melhor compreendido e, assim, combatida com mais eficiência. Desta forma, ao estudar a comunicação juncional em macrófagos, será possível não só compreender a função das junções comunicantes neste tipo de célula migratória, como também vislumbrar perspectivas para a modulação destas estruturas o que, conseqüentemente, contribuirá para o desenvolvimento de ferramentas que melhorem o desempenho destas células nesta patologia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) DOENÇA DE CHAGAS

2.1.1. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana, ou Doença de Chagas, tem como o agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* que vive e se multiplica no interior das células de uma variedade de tecidos e determina, no homem, quadros clínicos com características e consequências diversas (DURAN-REHBEIN et al., 2014).

O parasita é transmitido, geralmente, através da contaminação da conjuntiva, das mucosas ou de lesões cutâneas com as fezes e urina de um hospedeiro invertebrado, espécies de hemípteros hematófagos pertencentes à família Reduviidae e subfamília Triatominae (comumente conhecidos como “barbeiros”), como *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* sendo os vetores mais comuns (NORMAN and LÓPEZ-VÉLEZ, 2013) (**Figura 1**).

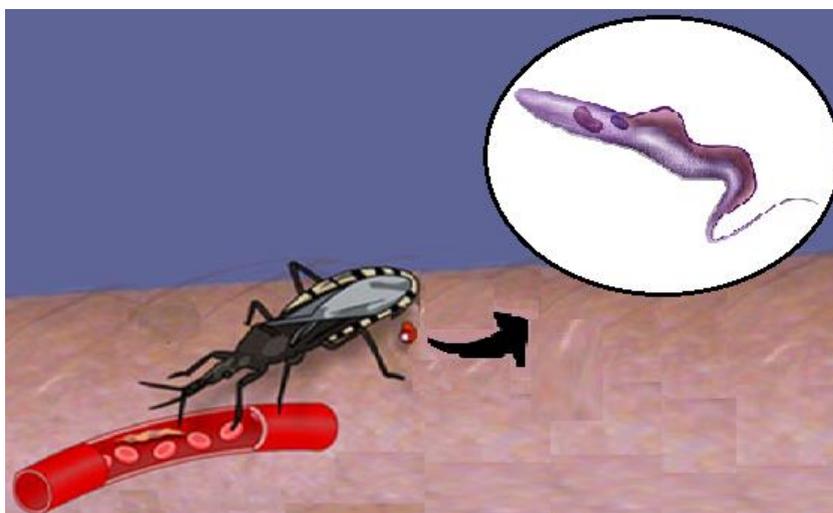


Figura 1: Imagem ilustrativa do parasito *Trypanosoma cruzi* e seu vetor, o barbeiro. Fonte: (Retirado e adaptado de TEIXEIRA et al, 2011).

A doença foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (STEVERDING, 2014). Fato único na história da medicina, Chagas conseguiu estabelecer a etiologia e o ciclo parasitário, identificar os insetos vetores, os reservatórios domésticos e silvestres e descrever a doença e seu diagnóstico (LACERDA, 2009; TEIXEIRA et al., 2011).

Esta doença é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo afetando entre 6 e 7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América, causando cerca de 12.000 mortes por ano (WHO, 2015) **(Figura 2)**.

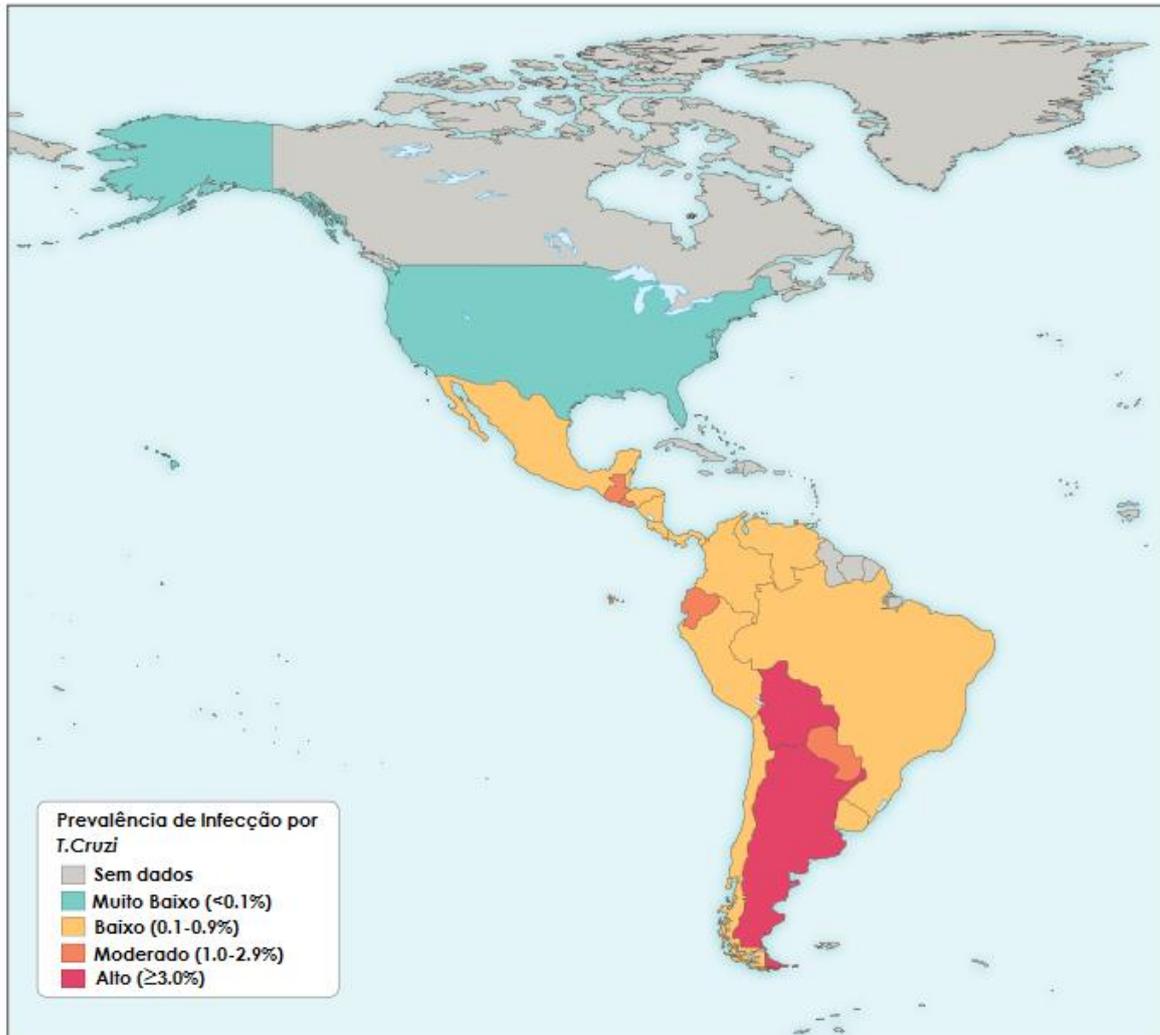


Figura 2: Mapa de prevalência estimada de Infecção por *Trypanosoma cruzi*. De acordo com o mapa, os países latino-americanos, principalmente o Brasil, possuem o maior índice de infecção com *T. cruzi*, (BERN, 2015).

2.1.2. Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*, assim como outros tripamossomatídeos, apresenta um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, com hospedeiros vertebrados mamíferos (que pode ser o homem) e insetos hemípteros (barbeiro) (TEIXEIRA et al, 2011).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, com várias formas de desenvolvimento nos insetos vetores e hospedeiros mamíferos (RASSI et al., 2010; RASSI et al., 2012). De acordo com a **Figura 3**, a contaminação do barbeiro ocorre pela sucção de sangue de mamíferos infectados com parasitos na forma tripomastigota - formas infectivas - que vão para o estômago do inseto e se diferenciam em epimastigotas (RASSI et al., 2012).

Quando as formas epimastigotas alcançam o intestino, começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária e aderem-se às membranas perimicrovilares que são secretadas pelas células intestinais. Esta adesão ocorre predominantemente pela região do flagelo (TEIXEIRA et al, 2011).

Posteriormente, os epimastigotas se soltam e se movem para o intestino posterior, onde iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (TEIXEIRA et al, 2011).

A infecção de mamíferos ocorre quando eles entram em contato com as formas metacíclicas infecciosas dos parasitos eliminados com as fezes e urina dos triatomíneos infectados durante o ato de alimentação destes insetos (RASSI et al., 2010). Os tripomastigotas metacíclicos acessam a circulação sanguínea, aderindo e invadindo uma gama de células nucleadas (BRENER, 1985) e, uma vez no citoplasma da célula eles se diferenciam em amastigotas (forma intracelular e replicativa) (DE SOUZA et al., 2010). Subsequentemente, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que são liberados após ruptura das células. No meio extracelular, os tripomastigotas podem infectar novas células de tecidos distantes (TEIXEIRA et al, 2011), principalmente células musculares e ganglionares (RASSI et al., 2012) ou, enquanto na circulação, serem capturados pelo inseto vetor, reiniciando o ciclo (DE SOUZA, 2000).

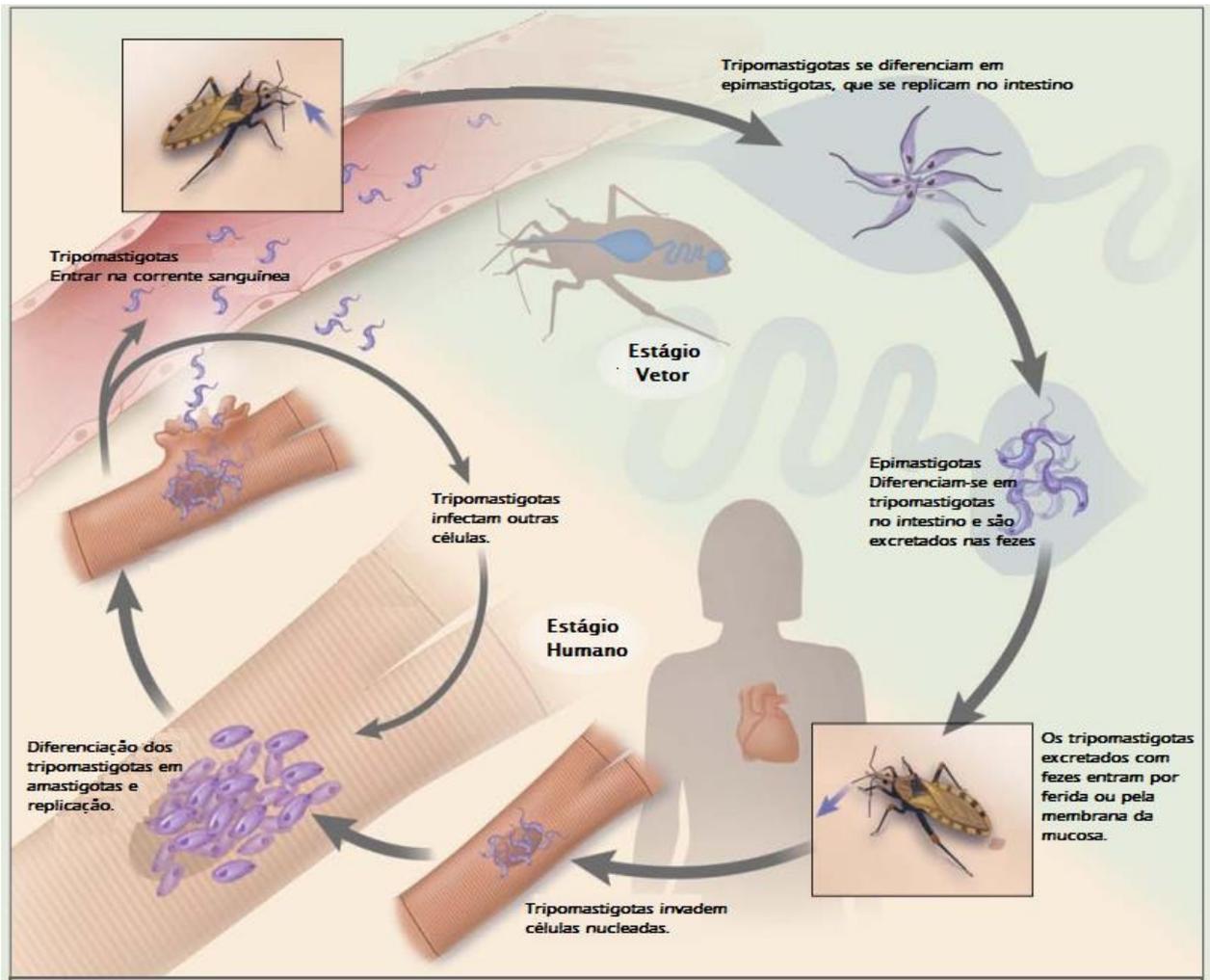


Figura 3: Figura esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* no barbeiro e no homem. O vetor triatomíneo, ao se alimentar de sangue de um mamífero infectado com *T. cruzi*, ingere as formas tripomastigotas circulantes. Os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que se replicam no intestino vetor e, posteriormente, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos infecciosos, que são eliminados com as fezes e urina do vetor. A infecção de mamíferos ocorre quando eles entram em contato com as formas metacíclicas infecciosas dos parasitos eliminados através de lesões cutâneas ou pela mucosa. Estas formas acessam a circulação sanguínea e invadem muitos tipos de células nucleadas. No citoplasma, as tripomastigotas se diferenciam na forma amastigota e se multiplicam por fissões binárias sucessivas. No final deste período, os amastigotas são transformados em tripomastigotas, as rupturas das células hospedeiras e os tripomastigotas são libertados para a circulação. Os parasitos circulantes podem então invadir novas células e iniciar novos ciclos replicativos ou, infectar vetores que se alimentam no hospedeiro (BERN, 2015).

2.1.3. Aspectos clínicos da Doença de Chagas

O parasito pode ser transmitido por diferentes formas: transmissão vetorial (parasito-hospedeiro) (GARCIA and DUARTE, 2016); por transfusão de sangue ou transplante de órgãos (COURA, 2015), transplacentária (da mãe para o filho em qualquer período da gestação) (GONTIJO et al, 2009; HOWARD et al, 2014), transmissão acidental, oral (em decorrência da ingestão de alimentos contaminados como o caldo de cana de açúcar, sucos de açaí e goiaba com formas tripomastigotas metacíclicas) (DE SOUZA, 2013; YOSHIDA, 2008; BARBOSA, 2006), sexual e através de outros vetores (MONCAYO, 2003; DIAS et al, 2011).

A entrada de *T. cruzi* em humanos pode ocorrer sem que apareçam sinais e sintomas, provavelmente devido ao pequeno número de parasitos que invadem o hospedeiro (RASSI et al., 2000).

A doença tem efetivamente duas fases clínicas (**Figura 4**) (CHATELAIN, 2017): a fase aguda (fatal para 2-8% das pessoas infectadas) dura até oito semanas e geralmente é assintomática ou não reconhecida. É caracterizada por alta parasitemia e parasitismo tecidual (RASSI JR. et al., 2010).

Os sintomas são geralmente leves e inespecíficos e incluem febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica. Em raros casos, um nódulo cutâneo (chagoma) ou edema de pálpebras prolongado indolor (sinal de Romaña) pode indicar o local da inoculação. (WHO, 2010; RASSI JR et al., 2010; BERN, 2011). Em menos de 1% das infecções, a fase aguda é grave e com risco de vida por causa de meningoencefalite ou miocardite (BERN, 2011).

O sistema imunológico do hospedeiro é então ativado, resultando numa redução dramática na carga do parasita com controle subsequente da infecção (FREITAS et al., 2005) entrando na chamada fase crônica da doença que pode ser dividida em duas fases: a fase crônica assintomática (ou indeterminada), que é encontrada em cerca de 60% a 70% dos pacientes infectados e pode variar entre meses, anos ou décadas. Nesta fase a Infecção é controlada, mas o sistema imunológico não impede a progressão da doença (CHATELAIN, 2017).

O estágio crônico, sintomática (ou determinada) se desenvolve em 10% a 40% dos pacientes tipicamente após décadas (BERN, 2015). Os processos patológicos, que surgiram na fase aguda, não desaparecem por completo e a

infecção adquire um curso subagudo, causando cardiomiopatias (MACHADO et al, 2012; DUTRA et al, 2014) e patologias do aparelho digestivo (PINAZO et al, 2010).

Independentemente da forma clínica, existem fortes evidências da participação do sistema imune na patogênese da doença de Chagas (DUTRA and GOLLOB, 2008). A presença do parasito parece ser fundamental para o desencadeamento do processo de surgimento das lesões e estudos correlacionam a presença do parasito, ou pelo menos de seus antígenos ou DNA, com os focos inflamatórios teciduais (MENEZES, 2015).

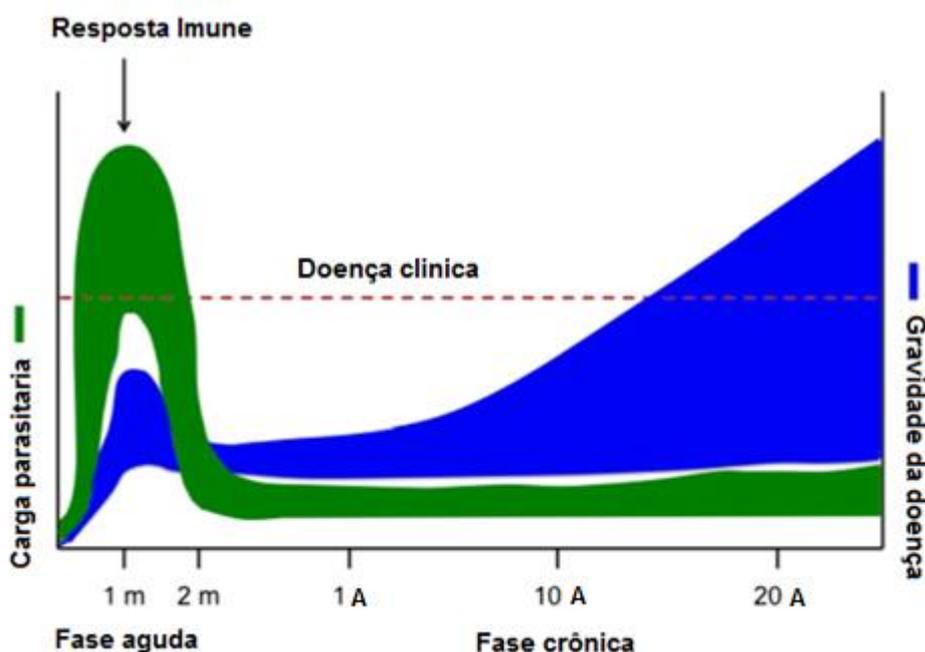


Figura 4: Progressão da doença de Chagas (adaptado de TARLETON, 2003). A infecção por *Trypanosoma cruzi* consiste em uma fase de doença aguda caracterizada por elevação da carga parasitária (verde). A resposta imune reduz a carga parasitária a níveis baixos / indetectáveis. A doença de Chagas então progride para a fase crônica, cuja gravidade (azul) depende do tempo desde a infecção e estado imunológico do hospedeiro ou antecedentes genéticos. Trinta a 40% dos pacientes chagásicos na fase crônica desenvolverão manifestações clínicas como cardiomiopatia ou megacólon; Os 60 a 70% restantes permanecerão assintomáticos (forma indeterminada da doença). M, mês; A, ano.

2.1.4. Interação *T.cruzi* - Célula Hospedeira

As formas tripomastigotas são capazes de infectar células cultivadas de mamíferos utilizando um processo que envolve duas etapas separadas (SOUZA, 2002). Em primeiro lugar, o parasita liga-se à superfície da célula-alvo num processo

que é mediado principalmente por glicoconjugados expostos à superfície de parasitas e de células-alvo (COLLI and ALVES, 1999; ACOSTASERRANO et al., 2001; VIEIRA et al., 2002) resultando na internalização do parasito na célula hospedeira.

Estudos recentes mostraram que os filamentos de actina são importantes durante a invasão de tripomastigotas tanto em células fagocíticas profissionais ou não-profissionais (VIEIRA et al., 2002; NAGAJYOTHI et al., 2008). O tratamento prévio de células hospedeiras com citocalasina D, um fármaco que promove a despolimerização da actina, estimula a invasão do parasita (CALER et al., 2000). Além disso, descreve-se um fator solúvel proteolítico gerado pelos tripomastigotas para promover uma desmontagem do microfilamento cortical na célula hospedeira (RODRIGUEZ et al., 1995). Este evento permite a migração de lisossomas dependente de cinesina induzida por Ca^{2+} até o ponto de internalização do parasita (RODRIGUEZ et al., 1996). No entanto, no caso dos macrófagos, observações morfológicas precoces sugeriram uma internalização fagocitária com a formação de um vacúolo endocítico contendo o parasita (DE CARVALHO and DE SOUZA, 1989; VIEIRA et al., 2002). Além disso, as formas tripomastigotas experimentam uma diminuição acentuada nas suas taxas de internalização quando macrófagos são previamente tratados com fármacos despolimerizadores de microfilamentos (CALER et al., 2000) ou quando os ensaios de interação são feitos a temperaturas de arrefecimento, uma condição experimental em que a reorganização de microfilamentos de actina é prejudicada.

Em cardiomiócitos embrionários de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, sofreram alterações eletrofisiológicas e estruturais, tais como quebra de filamentos de citoesqueleto, incluindo miofibrilas (MELO et al., 2006; TANIWAKI et al., 2006) e perda de adesão focal (MELO et al., 2004).

O íon cálcio é um importante segundo-mensageiro em células eucarióticas e diversos trabalhos já descreveram os efeitos da infecção pelo *T. cruzi* nos níveis e na dinâmica do cálcio na célula hospedeira. Um estudo pioneiro de infecção de células HeLa pelo *T. cruzi* realizado por OSUNA et al. (1990), demonstrou que houve um aumento de cálcio intracelular, e que este aumento esta relacionado com o processo de invasão da célula.

Este influxo de Ca^{2+} intracelular parece ser induzido por fatores solúveis secretados pelas formas tripomastigotas, criando um cenário favorável para a entrada do parasito na célula hospedeira: um aumento no cálcio citoplasmático libera mais cálcio estocado no retículo endoplasmático via IP3 e induz a despolimerização de filamentos de actina, facilitando a migração de lisossomos necessária para a invasão da célula pelo parasito (VIEIRA et al., 2002; ADESSE, et al, 2010). Utilizando lisados proteicos de tripomastigotas, BARR E COLABORADORES (1996) verificaram um aumento nos níveis de cálcio em cardiomiócitos obtidos de cães, induzido por uma enzima processadora do agonista de cálcio, mais tarde chamada de oligopeptidase B (CALER et al., 1998). Quando ativado, este agonista se liga ao seu receptor na célula hospedeira ativando fosfolipase C e gerando inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). O IP3 se ligaria ao seu receptor na membrana do retículo endoplasmático promovendo um aumento nos níveis de cálcio intracelular (CALER et al., 1998).

Por outro lado, em cardiomiócitos murinos, apenas a adesão da forma tripomastigota à membrana do miócito induziu aumentos sustentados no cálcio intracelular, também essencial para a invasão da célula hospedeira (GARZONI et al., 2003). Além de ter um papel na invasão do parasito, os níveis de cálcio citoplasmático parecem ter relevância para a multiplicação das formas amastigotas (ADESSE et al, 2010).

2.2. JUNÇÕES COMUNICANTES

2.2.1. Estrutura e Organização das Junções Comunicantes

As junções comunicantes (GJCs) ou *gap junction*, são canais intercelulares e hidrofílicos formados por proteínas transmembranares que permitem a troca de nutrientes, metabolitos (adenosina difosfato [ADP], glucose, lactato e Glutamato, entre outros), íons (permitindo o acoplamento elétrico), segundos mensageiros (adenosina monofosfato cíclico [AMPc] e trifosfato de inositol [IP3], dentre outros) e moléculas de até ~ 1 kDa entre células adjacentes (GOODENOUGH and PAUL, 2009; NIELSEN et al., 2012; GAJARDO-GÓMEZ et al, 2016). As GJCs têm papéis cruciais em muitos processos, incluindo diferenciação, atividade neuronal, desenvolvimento, respostas imunes e sincronização celular (GOODENOUGH and PAUL, 2003). Além disso, várias doenças humanas que possam vir a interromper a

homeostase em que o organismo humano se encontra são causadas por mutações nas conexinas, incluindo doenças neurodegenerativas, doenças da pele, surdez e anomalias do desenvolvimento (SAEZ et al, 2003; VILLANELO et al, 2017).

As junções comunicantes consistem de dois hemicanais, denominados conexons, de estruturas heptalaminares, apresentando um padrão hexagonal de subunidades de 7 a 8nm de diâmetro (GOODENOUGH and PAUL, 2009), e com espaços de aproximadamente 2 a 4nm entre as membranas das células adjacentes (GOODENOUGH and PAUL, 2003). Cada um composta por seis monômeros de subunidade de conexina dispostas em torno de um poro central de diâmetro de 1.5nm, permitindo que através do alinhamento dos hemicanais na membrana se tenha a comunicação entre as membranas das células adjacentes (GAIETTA et al, 2002), como proposto na **Figura 5** (MAKOVSKI et al., 1977).

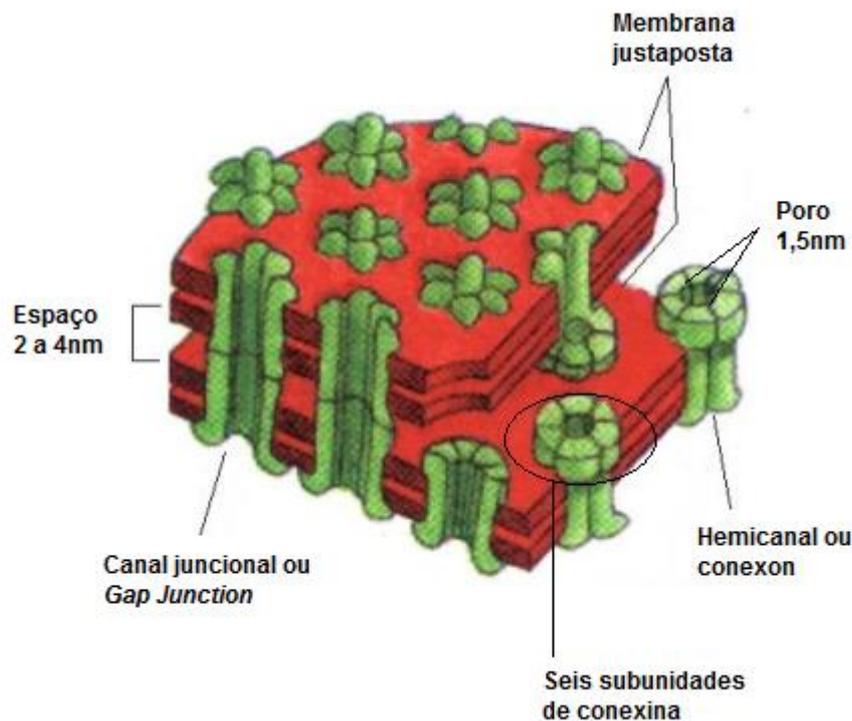


Figura 5: Esquema da organização dos canais juncionais na membrana plasmática. As junções comunicantes consistem de dois hemicanais, denominados conexons. Estes, apresentam um padrão hexagonal com espaços de aproximadamente 2 a 4nm entre as membranas das células adjacentes. Cada um composta por seis monômeros de subunidade de conexina dispostas em torno de um poro central de diâmetro de 1.5nm permitindo que através do alinhamento dos hemicanais na membrana se tenha a comunicação entre as membranas das células adjacentes (MAKOVSKI et al., 1977 adaptado por ALBERTS et al., 1994).

Os conexons podem ser homoméricos, constituídos de conexinas iguais, ou heteroméricos, quando são formados por conexinas diferentes. Em relação aos canais juncionais podemos classificá-los em homotípicos, quando o canal é formado por dois hemicanais idênticos ou heterotípico quando o canal é formado por dois conexons diferentes (LAIRD, 2006; TALBOT and VERRECCHIA, 2012).

Ainda, podemos classificar os canais em mono-heteromérico, quando há um conexon homomérico e um conexon heteromérico, ou bi-heteromérico, quando o canal é 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 como mostra a **Figura 6** (SOSINSKY, 1999; MORENO, 2004).

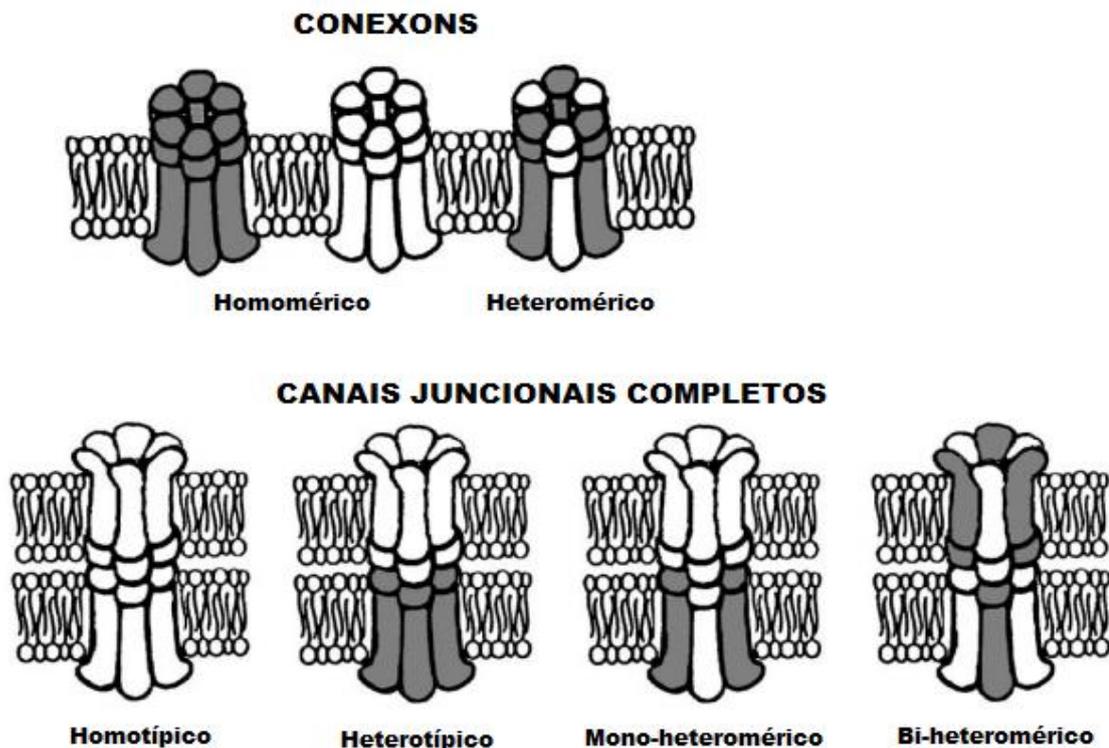


Figura 6: Esquema mostrando os tipos de conexons e canais juncionais formados por associação de conexinas iguais ou diferentes. Os conexons podem ser homoméricos, constituídos de conexinas iguais, ou heteroméricos, quando são formados por conexinas diferentes. Os canais juncionais podem ser homotípicos, quando o canal é formado por dois hemicanais idênticos ou heterotípico quando o canal é formado por dois conexons diferentes, ou ainda, mono-heteromérico, quando há um conexon homomérico e um conexon heteromérico, ou bi-heteromérico, quando o canal é 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 (MORENO, 2004).

2.2.2. Propriedades das Junções Comunicantes

A atenção à densidade eletrônica levou à proposta que as GJCs poderiam existir em pelo menos dois estados diferentes: aberto e fechado. Mais tarde, UNWIN and ENNIS (1984) propuseram que o estado das GJC era sensível à concentração de Ca^{2+} e que estes cátions divalentes promoviam a alternância entre os dois estados do canal. Portanto, foi estabelecido pela primeira vez que as GJCs poderiam não só transportar solutos, mas também, regular a permeabilidade entre as células (VILLANELO et al, 2017). Isso ocorre porque os canais intercelulares das diferentes conexinas têm diferentes propriedades, incluindo canais condutâncias unitária, dada por $G_j = I_j / V$, e que varia em torno de 30 a 300 pS (pico-siemens –

unidade de condutância elétrica) onde, G_j representa a condutância, I_j representa a intensidade de corrente que passa pelo canal juncional e V_j a voltagem transjuncional (VEENSTRA, 1999) e estados de condutância múltipla (GOODENOUGH and PAUL, 2009).

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., 1984). 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 conexina 43 (DHEIN, 1998). Além dos fatores biofísicos, vários fatores bioquímicos podem modular a condutância juncional, dependendo em que conexina ou tecido estão atuando.

Além disto, como já citado, alguns íons como Ca^{2+} , Mg^{2+} e H^+ , também influenciam na abertura ou no fechamento de canais. Os hemicanais livres são, na sua maioria, fechados sob condições fisiológicas (CONTRERAS et al., 2003), ou seja, porque têm baixa probabilidade de abertura (OP) devido a uma ou mais dos seguintes mecanismos: (i) um bloqueio por Ca^{2+} e Mg^{2+} extracelular em mM, (ii) um potencial de membrana negativo que fecha a maioria dos hemicanais e (iii) a modificação pós-tradução (ie, fosforilação) de alguns conexinas (CONTRERAS et al., 2003; JOHNSTONE et al., 2012).

No entanto, os hemicanais podem abrir em condições fisiológicas permitindo a comunicação entre espaço extracelular e intracelular (SÁEZ et al., 2010). Evidências experimentais mostram que a abertura de hemicanais ativa caminhos ligados à liberação ou absorção de moléculas parácrinas e autócrinas, tais como: ATP (**Figura 7**), glutamato, PGE2, NAD⁺ e glutatona. Os hemicanais também podem mediar a absorção de glicose, bem como íons extracelulares (RETAMAL et al., 2015)

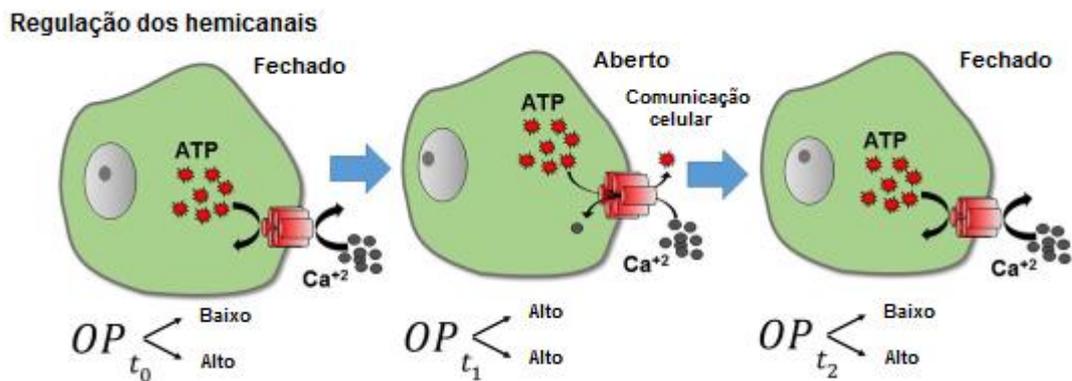


Figura 7. Representação da abertura e fechamento de canais. Em condições normais, os hemicanais apresentam uma probabilidade de baixa abertura (OP). Assim, quando os hemicanais são normalmente fechados (t_0 , PO baixo), não há troca com o meio extracelular. No entanto, quando os hemicanais abrem (t_1 , OP mais elevado), moléculas tais como ATP e Ca^{2+} podem fluir através deles. O cálcio pode ativar vias intracelulares e o ATP liberado da célula pode atuar como um sinal parácrino ou autócrino. Portanto, a célula está em um estado de comunicação (RETAMAL et al., 2015).

Outros fatores podem influenciar a condutância das junções comunicantes como o pH, que interfere na condutância juncional (diminuição) através da acidificação intracelular (DELMAR et al., 1999; SPRAY et al, 2006), algumas drogas (La^{3+} , mefloquina, carbenoxolona, octanol, heptanol, ácido aracdônico) ou peptídeos miméticos conexinas (Gap 26, 27) podem diminuir o grau de acoplamento, ou seja, a comunicação entre as células (XIA and NAWY, 2003; RETAMAL et al, 2015).

2.2.3. Estrutura das Conexinas

As junções comunicantes são formadas por uma família multigênica de proteínas transmembranares denominadas conexinas. Possui uma topologia estrutural com quatro domínios transmembrana apresentando uma estrutura em α -hélice (TM1, TM2, TM3 e TM4); uma porção C-terminal (COOH); uma porção N-terminal (NH_2); duas alças extracelulares (E1 e E2), cada um com três resíduos de cisteína conservados e, por isso, podem estar envolvidos na iniciação da interação entre conexons de células adjacentes e uma alça intracelular ou citoplasmática (AC) entre as regiões transmembrana 2 e 3. Estes domínios citoplasmáticos variam entre conexinas (KUMAR and GILULA, 1996; DUFFY et al, 2002; WILLECKE et al, 2002).

Observou-se um elevado grau de homologia entre E1, E2 e a região de interface de AC e M3. Pelo contrário, os domínios COOH, NH₂ e AC têm um menor grau de homologia. Estes diferentes graus de homologia são atribuídos a diferentes funções na regulação e às propriedades biofísicas dos GJs (**Figura 8**) (HERVE et al, 2004; DESPLANTEZ, 2017).

A análise das diferentes conexinas indica que o domínio transmembrana, M3, tem um carácter anfipático, sugerindo constituir a região central do canal juncional, aquele que forma as paredes do canal (KUMAR and GILULA, 1996).

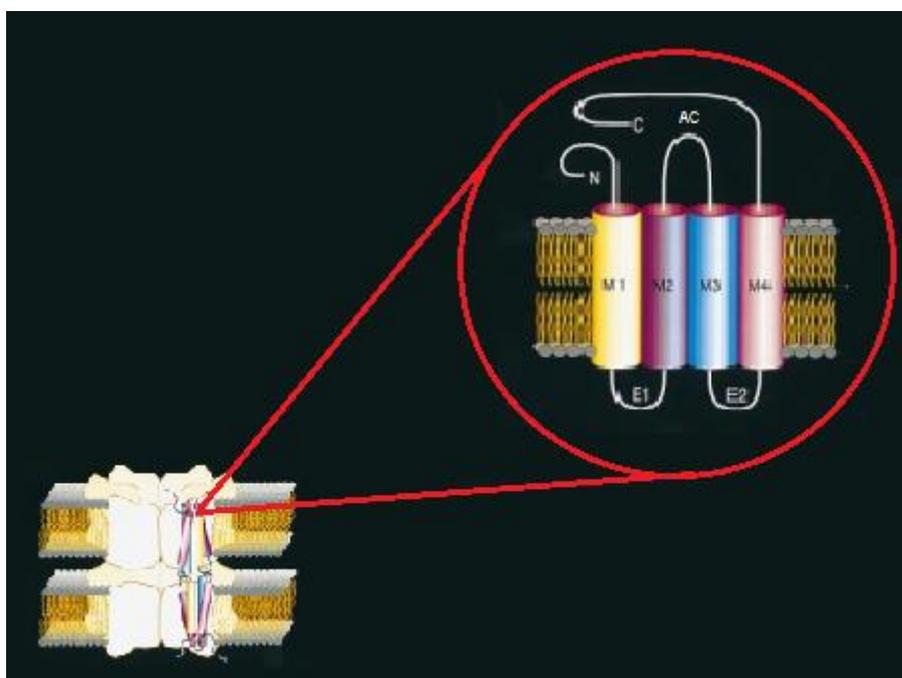


Figura 8: Modelo topológico da proteína juncional (conexina) na membrana plasmática. A conexina possui uma topologia estrutural com quatro domínios transmembrana apresentando uma estrutura em α -hélice (TM1, TM2, TM3 e TM4); uma porção C-terminal (COOH); uma porção N-terminal (NH₂); duas alças extracelulares (E1 e E2) e uma alça intracelular ou citoplasmática (AC) entre as regiões transmembrana 2 e 3 (Adaptado de KUMAR and GILULA, 1996).

As pesquisas sobre a multigenicidade da família das conexinas tiveram início na década de 1980. Os primeiros genes de conexina foram isolados e a posterior análise do genoma humano revelou a existência de mais de 20 genes codificando diferentes parálogos de conexina. (CRUCIANI and MIKALSEN, 2006; FUSHIKI et al, 2010).

A nomenclatura padrão das conexinas é baseada no peso molecular, em kDa, advindos das sequências de cDNA. As conexinas também podem ser classificadas

nos subgrupos α e β ou γ de acordo com a similaridade entre determinadas regiões da sequência proteica primária da conexina (WILLECKE et al, 2002; SEGRETAIN and FALK, 2004; ABASCAL and ZARDOYA, 2013).

Atualmente, existem 21 isoformas de conexinas no genoma humano e 20 no genoma de roedores com ortólogos em outras espécies de vertebrados (**Tabela 1.1**) (ABASCAL and ZARDOYA, 2013; GAJARDO-GÓMEZ et al, 2016).

TABELA 1. A tabela mostra a família multigênica das conexinas com 21 isoformas no genoma humano e 20 no genoma de roedores e sua nomenclatura padrão baseada no peso molecular (SOHL and WILLECKE, 2003).

| 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 |

2.2.4. Funções das Conexinas

Adicionalmente, a informação sobre a liberação *in vivo* de moléculas através de hemicanais é atualmente muito limitada. Entretanto, os dados disponíveis sugerem que os hemicanais estão de alguma forma envolvidos em diferentes processos fisiológicos, como o controle da adesão de monócitos em camundongos

(WONG et al., 2006), a liberação de neurotransmissores de astrócitos na amígdala basolateral (STEHBERG et al., 2012), a sinalização de Ca^{2+} em miócitos ventriculares adultos (LI et al., 2012), a atividade de neurônios sensoriais (RETAMAL et al., 2014) e a fisiologia e patologia de células ósseas (PLOTKIN, 2014). Além disso, os hemicanais podem também participar na liberação de ATP a partir de astrócitos para regular a transmissão sináptica basal glutamatérgica (CHEVER et al., 2014), na cicatrização de feridas (TAKADA et al., 2014), na função renal (SIPOS et al., 2009), no fluxo iônico em células de lente (BEYER and BERTHOUD, 2014; MANDAL et al., 2015) e no processamento visual da retina (KAMERMANS et al., 2001).

Mutações nos genes das conexinas podem estar associadas a diversas patologias graves (MESE et al., 2007). Além disso, a associação das doenças com a conexina específica também enfatiza a singularidade de cada proteína, porque a perda de uma isoforma não pode ser compensada pela presença de outras conexinas no mesmo tecido ou tipo de célula levando a defeitos fisiopatológicos (HARRIS, 2001).

Alterações nas conexinas 46 e 50 têm sido associadas ao desenvolvimento de diferentes tipos de cataratas, respectivamente congênita e senil (WHITE and BRUZZONE, 2000; BEYER and BERTHOUD, 2014).

Mutações no gene conexina 26 estão associadas a surdez síndrômica (surdez mais doença de pele) e não-sindrômica (MARTÍNEZ et al., 2009). Atualmente, sabe-se que várias mutações pontuais em Cx26 induzem distúrbios da pele e da audição, que juntos são conhecidas como síndrome de ceratite-ictiose-surdez (KID) (MEIGH et al., 2014; SANCHEZ et al., 2014).

Outra doença, como a de Charcot-Marie-Tooth (CMTX), afeta nervos periféricos por demielinização e por conseguinte as funções de nervos sensoriais e motores. Segundo BERGOFFEN et al (1993), esta doença está associada a mutações no gene codificante da conexina 32 devido à produção alterada de mielina por células de Schwann.

A Displasia Oculodentodigital (ODDD) trata-se de uma desordem hereditária negativa dominante causada por mutações no gene de codificação da conexina 43. Os pacientes do ODDD apresentam anormalidades nos dedos das mãos, dos pés, dos olhos, do rosto e dos dentes. Os roedores que expressam mutações na

conexina 43 imitam o fenótipo observado em seres humanos (DOBROWOLSKI et al., 2007, KOZORIZ et al., 2013).

As células cardíacas expressam Cx40, Cx43 e Cx45. Porém, a conexina 40 é expressa apenas em sistema de condução ventricular e atrial, enquanto a conexina 43 é, principalmente, expressa em cardiomiócitos (BAI, 2014). Evidências 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; PATEL et al., 2014, SUN et al., 2014).

Dados de GREEN and SEVERS (1993) demonstraram alterações na distribuição da proteína conexina 43 em corações de pacientes que desenvolveram o quadro de doença cardíaca isquêmica apos o infarto do miocárdio. O aumento da atividade de conexina 43 HC após infarto do miocárdio (JOHN et al., 1999, JOHANSEN et al., 2011) conduz ao mau funcionamento dos cardiomiócitos devido a uma entrada maciça de Ca^{2+} e Na^+ (LI et al., 2001; RETAMAL et al, 2015). Além disso, também contribui para a fibrose cardíaca (LU et al., 2012) e aumento da insuficiência cardíaca. Em camundongos “Knockout”, mutações na conexina 43 podem levar ao surgimento de malformações cardíacas que levam a diminuição da sobrevivência do animal (SEVERS et al., 2004)

A conexina 43, sob condições fisiológicas, também exerce função no sistema nervoso (SN), como por exemplo, em modulação (STEHBERG et al., 2012, CHEVER et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que algumas condições patológicas aumentam em particular a atividade dos hemicanais de astrócitos formados por conexina 43, os quais foram correlacionados com o mau funcionamento neuronal e morte (ORELLANA et al., 2012).

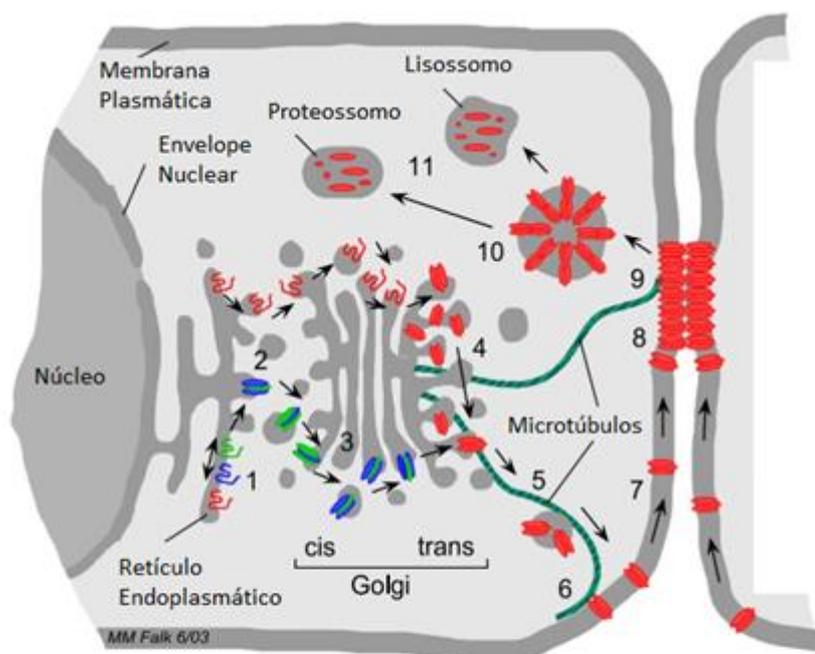
As conexinas desempenham um papel fundamental na homeostase de órgãos e tecidos permitindo que citoplasmas de células adjacentes, troquem metabolitos e informações necessárias para a manutenção dos tecidos e de suas respectivas funções (HERVE et al, 2004).

2.2.5. Conexinas na Formação e das Junções Comunicantes

As conexinas são sintetizadas pelos ribossomos no retículo endoplasmático (RE), sendo co-traduzidas integralmente na membrana do retículo endoplasmático

rugoso (SEGRETAIN and FALK, 2004; FALK et 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) (SEGRETAIN and FALK, 2004; EVANS et al, 2006). 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 9)** (DHEIN, 1998, GAIETTA et al., 2002; SEGRETAIN and FALK, 2004).

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 que irão se fundir com lisossomos e proteossomos (GAIETTA et al., 2002; SEGRETAIN and FALK, 2004).



| Legenda | |
|--------------------------------------|----------------------|
| ● | Cx26 |
| ● | Cx32 |
| ● | Cx43 |
| ● | = Conexon |
| ●● | = Junção Comunicante |

Figura 9. Representação esquemática das etapas que levam à síntese, montagem e degradação de canais de membrana de junção gap. A biossíntese e degradação da *gap junction* envolve (1) síntese de polipeptídeos de conexasina em membranas de retículo endoplasmático, (2) oligomerização de conexasinas homo- e heteroméricas de *gap junction* (hemicanais), (3) passagem através das pilhas de Golgi, (4) armazenamento intracelular (6) inserção de conexões na membrana plasmática, (7) difusão lateral dos conexasinas na membrana plasmática, (8) agregação de canais de junção de lacunas individuais em placas, (9) Estabilização de extremidades mais elevadas dos microtúbulos periféricos através da ligação a das *gap junctions* com base em Cx43, (10) internalização da placa de canal que conduz a junções anulares citoplasmáticas e (11) degradação completa através de vias lisossômicas e proteossômicas. (adaptado de SEGRETAIN and FALK, 2004).

As conexasinas são proteínas de curta duração. No coração de mamíferos, a produção de conexasina 43 possui uma meia-vida de 2-4 horas (LAIRD, 2005; LAIRD, 2006), mas é provável que haja variação. A conexasina 49, por exemplo, expressa em tecido de lente ovina, tem uma meia-vida de 10 horas (BREIDERT et al, 2005). O tráfego e montagem das conexasinas é rápida e altamente regulamentada varia de 3 a

30 minutos, com uma velocidade de formação de 1,3 canais por minuto (DHEIN, 1998; BERTHOUD et al, 2004).

Tradicionalmente, as conexinas foram consideradas como simples proteínas formadoras de poros que exibem pouca ou nenhuma interação com outros componentes celulares. Assim, grande parte dos trabalhos sobre junções foi centrado na estrutura e na função das conexinas (SPRAY et al, 1999). Hoje, é sabido que, as conexinas têm interações ricas com uma miríade de outras proteínas que podem revelar-se importantes em aspectos biológicos da abertura das junções, incluindo função, regulação e estrutura (**Figura 10**) (DUFFY et al, 2002).

As funções das conexinas dizem respeito a onde se associam com proteínas acessórias durante o trânsito para a membrana plasmática. Sugere-se que, as proteínas interagem com a cauda C-terminal citoplasmática das conexinas incluindo as proteínas de junção aderentes: zonas ocludentes (ZO-1) - proteína de andaime citoplasmático que interage diretamente com conexina 43 e outras conexinas através de seu domínio PDZ-2, ocludinas e claudinas (específicas para conexina 32), tubulina e Src quinase - molécula efetora de vias de sinalização múltiplas, como as que envolvem MAPK e PKC (DUFFY et al, 2002; EVANS et al, 2006; THÉVENIN et al., 2013). Outras proteínas associadas à conexina 43 estão continuamente sendo identificados, e agora incluem drebrin (BUTKEVICH et al, 2004), p120 catenina - envolvida na modulação de células em motilidade e CIP150 (AKIYAMA et al, 2005). Integrina $\alpha 5$ associada especificamente com a conexina 43 influencia o *gating* do canal durante tensão de cisalhamento (LAIRD, 2005; EVANS et al, 2006). A calmodulina é integrada na abertura das junções via biogenética (PERACCHIA, 2004), sugerindo interação com conexinas. Outros estudos mostram que a calmodulina é importante Na oligomerização das conexinas (AHMAD et al, 2001).

Além disso, estudo feito por PIEH et al. (2007) mostraram que filamentos de actina (corados com rodamina-faloidina) estão colocalizados com placas de junção de gap Cx43-GFP e vesículas de junção. Sugerindo o papel de estabilização e internalização da actina em junção gap (BUTKEVICH et al., 2004; FALK et al, 2016).

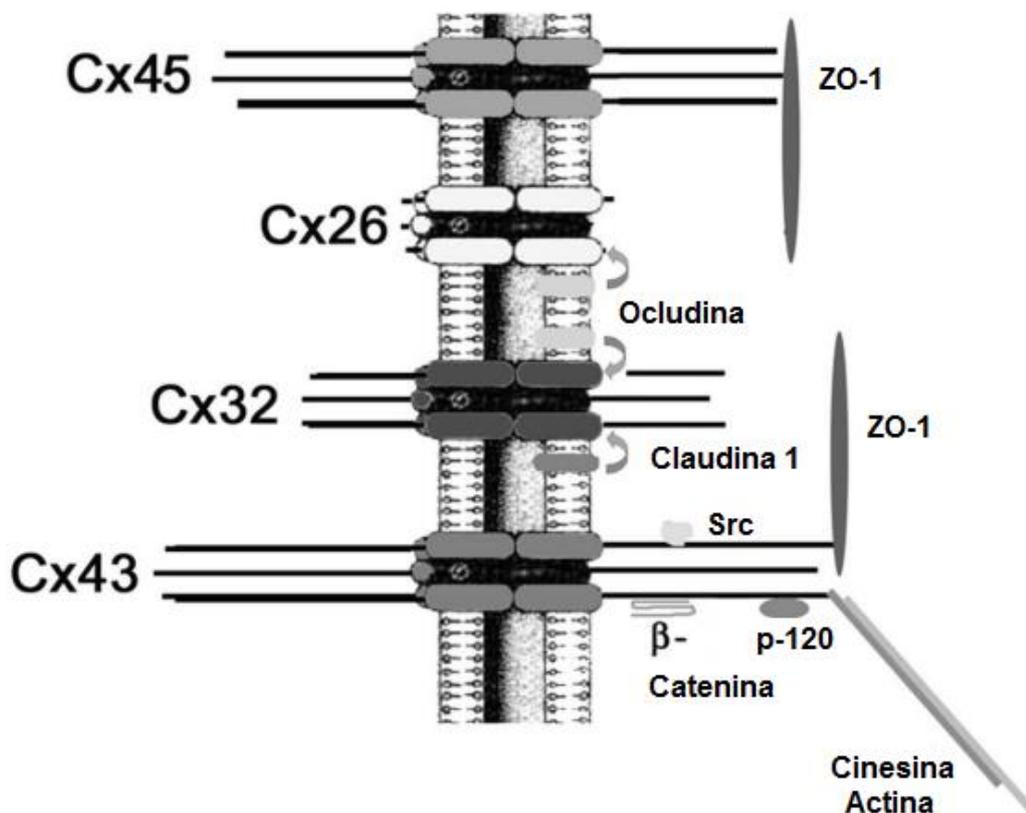


Figura 10. Esquema mostrando os parceiros de ligação conhecidos para conexinas. As funções das conexinas dizem respeito a onde se associam com proteínas acessórias durante o trânsito para a membrana plasmática. As proteínas que interagem com as conexinas são proteínas de junção aderentes - zonas ocludentes (ZO-1) que interage diretamente com conexina 43 e outras conexinas através de seu domínio PDZ-2, ocludina e claudinas (especificas para conexina 32), tubulina e Src, p120 e filamentos de actina (DUFFY et al, 2002).

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 (CRUVINEL, 2010; ABBAS, 2011). A resposta imunológica se divide em imunidade inata ou natural e imunidade adaptativa ou adquirida. A primeira 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. A segunda é estimulada pela exposição a agentes infecciosos, ou seja, surge em resposta a infecção e se “adapta” a infecção

(Figura 11) (MEDZHITOV and JANEWAY JR, 2000; CRUVINEL et al, 2010; ABBAS et al, 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. Reações inflamatórias estão envolvidas em várias condições patológicas, incluindo doenças agudas e crônicas. (CUZZOCREA, 2005). É caracterizado pela liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento e pela transmigração de células inflamatórias, tais como neutrófilos, monócitos, macrófagos, complemento, citocinas e proteínas de fase aguda, do sangue para o tecido afetado. As respostas imunes adaptativas locais também podem promover inflamação (MEDZHITOV et al, 1997; CHEN and NUÑEZ, 2010). Embora a inflamação sirva a uma função protetora no controle de infecções e promoção de reparo tecidual (MOSSMAN and CHURG, 1998; ROSS, 1999; COUSSENS and WERB, 2002; WEINER and FRENKEL, 2006).

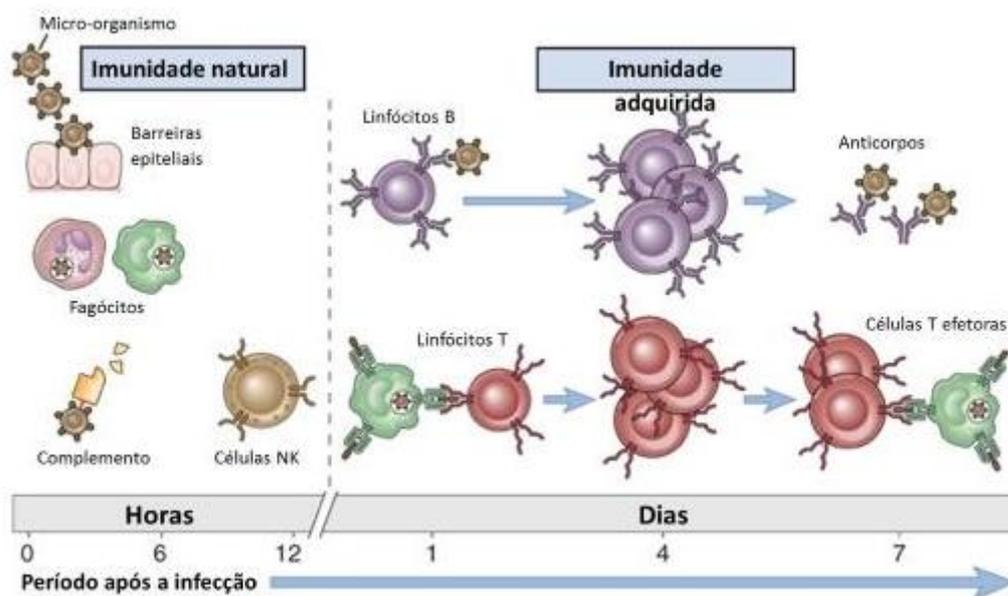


Figura 11. Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções e é caracterizado pela liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento e pela transmigração de células inflamatórias, tais como neutrófilos, monócitos, macrófagos, complemento, citocinas e proteínas de fase aguda, do sangue para o tecido afetado. A resposta imune adaptativa desenvolve-se posteriormente e consiste na ativação dos linfócitos T e linfócitos B. A resposta adaptativa tem memória, de modo que a exposição subsequente leva a uma resposta mais vigorosa e rápida, porém leva vários dias ou semanas para ser desenvolvida. (ABBAS et al, 2011).

Durante os primeiros estágios da infecção ou dano tecidual, há liberação de citocinas de macrófagos ativados. As citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a micro-organismos e outros antígenos, mediando a regulação das respostas imunológicas e inflamatórias (ABBAS et al, 2011).

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 *natural killer* (NK) e mastócitos em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (ABBAS et al, 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 (VON ANDRIAN and MACKAY, 2000). 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 (monócitos), neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais (CUZZOCREA, 2005). Sua produção também é induzida por PAMPs (CHEN and NUÑEZ, 2010; TAKEUCHI and AKIRA, 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 (TROWBRIDGE and EMLING, 1996).

2.3.1. 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 micro-organismos (JAWETZ et al.,1995).

A diferenciação de macrófagos depende inicialmente da formação de monócitos que ocorre na medula óssea. Monócitos são diferenciados a partir de células tronco hematopoiéticas precursoras (GUIMARÃES and DA GAMA FILHO, 2009). Estruturalmente os macrófagos estão organizados da seguinte maneira: (1) o núcleo detém um aspecto ovoide, 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 contém o material englobado pela célula, formando agora o que se chama de lisossomas secundários ou fagossomas, nos quais se processa a digestão (**Figura 12**) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

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 substâncias que participam do processo de defesa, o que faz com que o número de vacúolos, de lisossomas e de outras estruturas internas aumente, modificando sua morfologia, ou até mesmo se fusionem com outros macrófagos formando as denominadas células gigantes multinucleadas (JAWETZ et al., 1995; JUNQUEIRA and CARNEIRO, 2013; GUIMARÃES and DA GAMA FILHO, 2009).

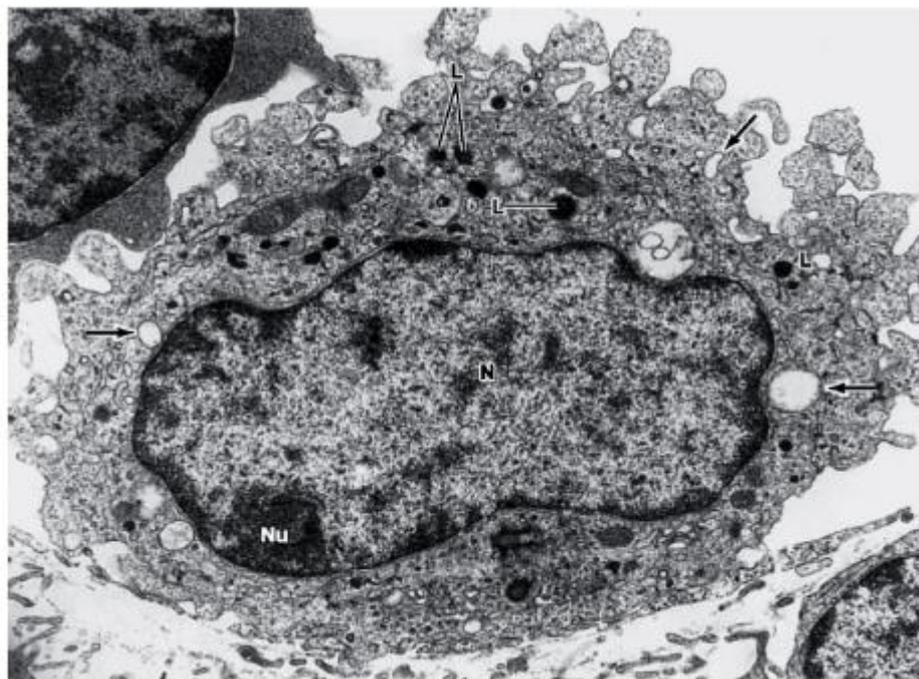


Figura 12. Micrografia eletrônica de um macrófago, apresentando a membrana pregueada e núcleo ovoide. L= Lisossomas, N= Núcleo, Nu= Nucléolo e Vacúolo fagocítico (Junqueira e Carneiro, 2013).

2.3.2. Funções e Interação Celular

Os macrófagos detêm como funções principais: (1) a capacidade de eliminar micro-organismos através de fagocitose; (2) são células apresentadoras de

antígenos (APCs), processam e apresentam antígenos via moléculas de MHC estimulando, assim, a resposta mediada por Linfócito T (CRUVINEL et al, 2010; ABBAS et al, 2011).

A fagocitose tem início com o reconhecimento dos micro-organismos pelos macrófagos ou pela interação com o interferon- γ (IFN- γ), produzido por células *natural killer*, ocorrendo pelo estímulo de receptores presentes na membrana desta célula, desencadeando reações intracelulares (CERWENKA and LANIER, 2001). Dentre os receptores de membrana presentes nos macrófagos estão: (1) os receptores com sete domínios transmembrana em α -hélice (ADEREM and UNDERHILL, 1999); (2) os receptores de manose; (3) receptores *Toll-like 4* (TLR4) – reconhece LPS (lipolissacarídeo) (AKIRA and TAKEDA, 2004; CRUZ-MACHADO, 2010).

A morte dos micro-organismo ocorre por uma combinação de dois mecanismos: através da formação de fagolisossoma pela junção do fagossoma e dos lisossomas presentes no citoplasma contendo enzimas ou a conversão catalítica do oxigênio molecular, onde os fagolisossomas contendo micro-organismos englobados associam-se a intermediários reativos do oxigênio (ROIs) e óxido nítrico, fazendo com que o pH dentro deste local se torne ácido, eliminando o micro-organismo capturado (MACMICKING et al., 1997; PARKIN and COHEN, 2001).

A ingestão e a morte de organismos são mais eficazes se a partícula é primeiro opsonizada com anticorpo e complemento específico (C3b). Uma vez que o anticorpo se liga à superfície da bactéria, o fagócito pode se ligar ao fragmento Fc e C3b do anticorpo e ingerir a bactéria através de formação de pseudópodes (**Figura 13**). Alguns organismos encapsulados, tais como pneumococos e haemophilus, não são susceptíveis à fagocitose de neutrófilos a menos que primeiro sejam revestidos com anticorpo (TROWBRIDGE and EMLING, 1996; PARKIN and COHEN, 2001).

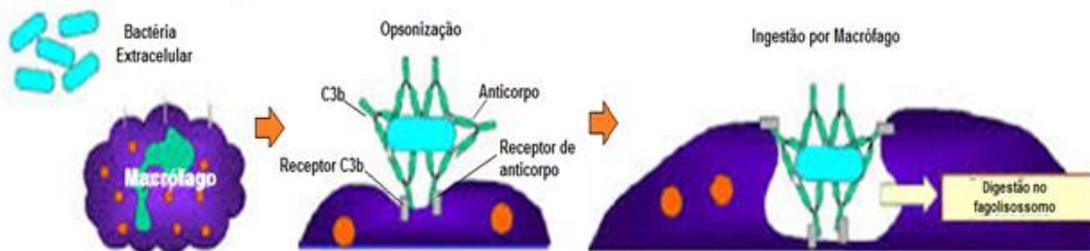


Figura 13. Desenho esquemático mostrando a ligação do fagócito à bactéria. A ingestão e a morte de micro-organismos são mais eficazes se a partícula é primeiro opsonizada com anticorpo e complemento específico (C3b). Uma vez que o anticorpo se liga à superfície da bactéria, o fagócito pode se ligar ao fragmento Fc e C3b do anticorpo e ingerir a bactéria através de formação de pseudópodos (Adapt.de biologia-ap.no.comunidades.net/mecanismos-de-defesa-especificos. Acesso: 10/03/2017 as 19:36h).

Diferentes classes de micro-organismos (ex.: vírus, bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, fungos, protozoários) expressam diferentes PAMPs. Essas estruturas incluem os ácidos nucleicos (RNA de dupla hélice encontrado nos vírus em replicação ou sequências CpG de DNA não metiladas encontradas em bactérias), características de proteínas com iniciação N-formilmetionina, lipopolissacarídeos (LPS) em bactérias gram-negativas, ácidos teicóicos em bactérias gram-positivas e oligossacarídeos ricos em manose encontrados em glicoproteínas microbianas (ABBAS et al, 2011).

Os componentes da resposta imune inata interagem de diferentes maneiras com a resposta imune adaptativa fornecendo sinais que agem com o antígeno para estimular a proliferação e a diferenciação de linfócitos T e B (**Figura 14**). Embora as principais células envolvidas na resposta imune adquirida sejam os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos (APCs) desempenham papel fundamental em sua ativação, apresentando antígenos associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) para os linfócitos T (DELVES and ROITT, 2000; CRUVINEL et al, 2010).

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, várias funções passam a se tornar constantes no sistema imune infectado. Paralelamente aos eventos que envolvem a fagocitose, a produção de citocinas, que irão desencadear respostas celulares imediatas, também se encontra aumentada, e substâncias como o TNF- α e interleucinas-1 e 12, irão estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos-T, amplificando a resposta imune favorecendo o processo de resolução da infecção e/ou reparação tecidual (SCHAIBLE et al., 1998).

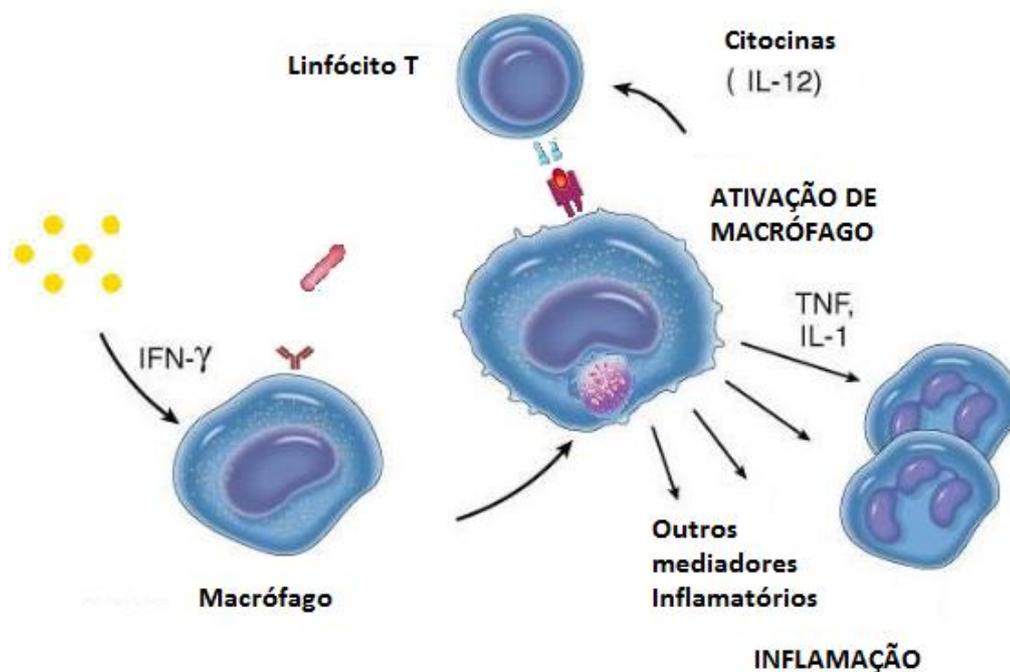


Figura 14. Desenho esquemático da resposta inflamatória a agentes microbianos por fagocitose. A fagocitose tem início com o reconhecimento dos micro-organismos pelos macrófagos ou pela interação com o interferon- γ (IFN- γ), produzido por células *natural killer*, ocorrendo pelo estímulo de receptores presentes na membrana desta célula, desencadeando reações intracelulares e ativando mecanismos de resposta a estes micro-organismos. O macrófago expõe em sua superfície fragmentos do micro-organismo capturado para que seja, então, apresentado aos linfócitos-T que migrarão para o sítio de inflamação, e produzirá IFN- γ . Também se encontra aumentada substâncias como o TNF- α e interleucinas-1 e 12, irão estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos-T, amplificando a resposta imune (Retirado e Adaptado de <http://centrotecnico.shinsei.com.br/fisiopatologia-dos-granulomas> Acesso: 11/03/2017 as 10:23h)

2.4. Junções Comunicantes em Macrófagos

Especificamente, estudos acerca da presença de junções comunicantes em macrófagos tiveram início 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. Na microscopia eletrônica de transmissão foi observada uma orientação em cadeia linear dos macrófagos, onde haviam regiões de grande contato entre as células, sendo denominadas *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 análise e a identificação de regiões com a presença de junções comunicantes (PORVAZNISK and MACVITTIE, 1979). Entretanto, no início 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 and BOLS, 1980). Contudo, mesmo com tais resultados, não foi descartada a comunicação entre macrófagos. 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 coculturas de fibroblastos com macrófagos. Neste mesmo trabalho foi observada a passagem de corante FITC-dextran 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 and STEINBERG demonstraram que macrófagos elicitados de camundongo e células da linhagem macrofágica J774 possuíam mensagem e expressão para conexina 43, utilizando respectivamente técnicas de *Northern 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 conexina 43 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 co-cultura, vindo a ocorrer apenas entre células endoteliais adjacentes.

Contudo, macrófagos espumosos (com acúmulo de colesterol) advindos de lesões arterioescleróticas humanas apresentavam mRNA para conexina 43 em experimentos de hibridização *in situ* (POLACEK et al., 1993). 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 macrófágica J774-A1. De acordo com os dados obtidos tanto os macrófagos quanto as células J774-A1 expressavam conexina 43, porém 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 macrófágicas 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 macrófágica 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 IFN- γ (interferon- γ) e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α) e com IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS).

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

Em 2004, FORTES et al. demonstrou através de ensaios de RT-PCR (PCR em tempo real - ensaio de análise de expressão gênica), *western blot*, Imunofluorescência e injeção de corantes, que células da linhagem macrófágica J774-G8 e macrófagos peritoneais advindos de camundongos suíços expressam junções comunicantes funcionais formadas pela proteína conexina 43, sem a necessidade de qualquer tratamento com citocinas.

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 tais como peptidoglicanos, lipopolissacarídeo (LPS), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interferon (IFN), que podem influenciar a expressão de junções comunicantes e ajudar no recrutamento de componentes associados à resposta imunológica inata e adaptativa (HANDEL et al, 2007).

2.5. Junções Comunicantes na Doença de Chagas

As junções comunicantes também executam um papel de destaque em estudos associados com infecções parasitárias. Estudos de alterações em miócitos cardíacos durante a infecção *in vitro* com *Trypanosoma cruzi* indicam que o parasita é capaz de prejudicar o funcionamento da célula hospedeira através de alterações na comunicação célula-célula (DE CARVALHO et al., 1992) onde a manutenção de contrações sincrônicas requer junções comunicantes funcionais (DUFFY et al, 2006).

Em estudo realizado por ADESSE et al (2010), foram examinados a taxa de batimento espontâneo de ratos infectados por *T. cruzi* e cardiomiócitos de rato encontrando efeitos opostos nas duas espécies de murídeo (DE CARVALHO et al., 1992; BERGDOLT et al, 1994; CARVALHO et al., 1994) em células de camundongos infectados, os batimentos foram maiores, enquanto que em miócitos de ratos infectados, os batimentos eram mais lentos e menos rítmicos.

Estudos em cardiomiócitos de ratos após a infecção com cepas de Y ou de *T. cruzi* Tulahuan (DE CARVALHO et al, 1992; ADESSE et al, 2008) demonstraram que a Conexina 43 de células infectadas foi substancialmente inferior a 72 h após a infecção; acoplamento entre células não parasitados em infectado não foi afetada, indicando que os fatores segregados para o meio não são susceptíveis de ser responsável pela diminuição da Cx43 (DE CARVALHO et al, 1998). Este trabalho indicou 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 (DE CARVALHO et al, 1992). Além disso, astrócitos e células da meninge (pia-máter e aracnoide) quando infectados *in vitro* e *in vivo* por *T. cruzi* (Talahuen) e *Toxoplasma gondii*, também apresentaram redução no acoplamento celular e na marcação para Cx43 e Cx26.

Os autores argumentam que estes resultados conflitantes poderiam ser explicados por uma possível alteração no transporte da conexina 43 para a membrana plasmática ou porque a região de conexina 43 que o anticorpo reconhece estaria mascarada devido a alterações conformacionais da proteína.

3. OBJETIVOS

O **objetivo geral** do presente estudo é avaliar a modulação estrutural e funcional das junções comunicantes formadas pela Conexina 43 (Cx43) em linhagens macrofágicas J774-G8 após a infecção com o parasito *Trypanosoma cruzi* e em tratamentos destas células com fatores pró-imune-inflamatórios – IFN- γ e TNF- α - que mimetizem ambientes infectados em um intervalo de 24h, 48h e 72h.

Os **objetivos específicos** deste estudo são:

1) Avaliar o crescimento e a morfologia celular de células de linhagem macrofágica J774-G8 tratadas com fatores pró-imune inflamatórios IFN- γ e TNF- α ou infectadas com o parasita *T. cruzi* em intervalos de 24h, 48h e 72h

2) Analisar o perfil de comunicação celular de células de linhagem macrofágica J774-G8 tratadas com fatores pró-imune inflamatórios IFN- γ e TNF- α ou infectadas com o parasita *T. cruzi* em intervalos de 24h, 48h e 72h através de injeção de corantes;

3) Estudar a expressão proteica da Cx43 em células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o parasita *Trypanosoma cruzi* por transferência imunoeletrorética em intervalos de 24h, 48h e 72h;

4) Analisar a expressão e a localização da proteína Cx43 em células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o parasita *Trypanosoma cruzi* por imunofluorescência em intervalos de 24h, 48h e 72h.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CULTURA DE CÉLULAS

4.1.1. Células da 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 (Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ, Rio de Janeiro), foi cedida pelo Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira, do Laboratório de Bioengenharia Tecidual – Labio - Inmetro.

As culturas foram crescidas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (V/V) (GIBCO) 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma). As células foram mantidas em estufa de CO₂ (Cuture CO₂ Incubator, modelo CCL-170B-8, Sigapore) a 37 °C.

As células foram plaqueadas, com uma densidade inicial de 1x10⁶ células/mL, em garrafas de plástico de 25 cm² (CORNING / USA), em lamínulas de vidro número 1 (*Fisherbrand / Fisher Scientific*) ou em placas de cultura de plástico de 35 mm de diâmetro (*Kasvi / China*).

4.1.2. Obtenção das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y

Formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foram cedidas pelo Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF – UFRJ). Os parasitos, em sua forma tripomastigota, foram mantidos em culturas de células LLCMK-2 em meio DMEM suplementado com 2% de soro fetal bovino (GIBCO) por seis dias em estufa de CO₂ (Cuture CO₂ Incubator, modelo CCL-170B-8, Sigapore) a 37 °C. (ANDREWS and COLLI, 1982). Após o 6º dia da infecção, quando ocorre o pico de liberação das formas tripomastigotas, os parasitos foram coletados do sobrenadante das células LLCMK-2 e centrifugados a 2332 x g por 10 minutos (Centrífuga Nova Técnica, modelo NT 810, São Paulo).

As interações parasito-célula foram feitas em garrafas de plástico de 25cm² (CORNING / USA) e em lamínulas de vidro número 1 (*Fisherbrand Fisher Scientific*), ou em placas de cultura de plástico de 35 mm de diâmetro com células de linhagem macrofágica J774-G8, em seu estado de confluência, na proporção de cinco parasitos por célula (5:1) - segundo protocolo de RAMIREZ E COLABORADORES (1993) – em janelas de 24h, 48h e 72h.

A manutenção e o plaqueamento das células foi idêntico para as células J774-G8 controle.

4.1.3. Tratamento com fatores pró-Imune inflamatórios

Através do protocolo determinado por SEABRA et al. (2002), ensaios de interação foram realizados com células de linhagem macrófágica J774-G8, em seu estado de confluência, ativados com 50 ng/mL de interferon- γ recombinante de camundongo (IFN- γ ; Sigma) e 50 ng/mL Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α ; Sigma) de forma combinada ou isolada numa janela de 24h, 48h e 72h.

As interações foram feitas em garrafas de plástico de 25cm² (CORNING / USA) e em lamínulas de vidro número 1 (Fisherbrand/ Fisher Scientific), ou em placas de cultura de plástico de 35 mm de diâmetro (Kasvi/ China).

A manutenção e o plaqueamento das células foi idêntico para as células J774-G8 controle.

4.2. Avaliação do crescimento celular e dos aspectos morfológicos

As culturas de células J774-G8 controle, tratadas com fatores pró-imune inflamatórios (IFN- γ e TNF- α) e infectadas com *T. cruzi* em intervalos de 24h, 48h e 72h foram submetidas a uma avaliação de crescimento celular e de sua morfologia por meio de imagens obtidas no microscópio invertido (Axiovert 40 CFL, ZEISS, Alemanha) nos aumentos de 100x e 400x.

Nestes tempos, a aglomeração celular, desprendimento das células e aspecto geral da monocamada celular foram monitorados.

Os aglomerados celulares podem variar em número de células, dimensão da célula e núcleo celular e no empacotamento ou disposição espacial das células (LIMA, 2008).

Neste trabalho foi determinado como grumos celulares duas ou mais células unidas por seus núcleos, citoplasmas ou membranas. Foram selecionados cinco imagens de cada grupo (controle, tratadas e infectadas) e os grumos celulares foram contados pelo cálculo da média e o desvio padrão das imagens.

Para a análise da morfologia celular foi observado que os macrófagos são células grande que possui diâmetro entre 25 a 50 μ m. Seu núcleo é grande e central e apresenta cromatina frouxa e presença de grumos elétron-densos.

O citoplasma contém complexo de Golgi desenvolvido e uma grande quantidade de vesículas pinocíticas, lisossomos e vacúolos. Também são encontradas vesículas em processo de fusão com fagossomos formando os fagolisossomos. O citoesqueleto formado por filamentos de actina e microtúbulos é bem organizado e confere a superfície da célula um aspecto ondulado, o citoesqueleto desempenha importante função no desenvolvimento de pseudópodes durante os eventos fagocíticos e de locomoção da célula (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

4.3. Imunoeletrortransferência

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) (Vetec), etanol 5% (Vetec), ácido fosfórico 10% (Vetec) e água, foram adicionados à amostra a ser dosada. As alíquotas foram distribuídas em triplicatas nas diferentes concentrações. Estas foram homogeneizadas e comparadas a uma curva padrão obtida com albumina bovina sérica (1mg/mL) (Sigma). As leituras de densidade óptica foram realizadas em comprimento de onda (λ) de 595nm em espectrofotômetro (SHIMADZUR, modelo UV-2450, Japão).

Em seguida, as células foram lavadas e retiradas por raspagem com uma solução de PBS 1% (*phosphate buffered saline*) com bicarbonato de sódio, pH 8,3 na concentração de 1 mM. Após a raspagem, as células foram centrifugadas a 428 x g durante 10 minutos (Centrífuga Nova técnica, modelo NT 810, São Paulo). O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi ressuspenso em 3 mL de solução Tween-20 1% (Sigma), centrifugado a 428 x g (Centrífuga Nova técnica, modelo NT 810, São Paulo) durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi ressuspenso e armazenado em solução de bicarbonato de sódio, pH: 8.3 na concentração de 1 mM e um 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) (Sigma).

A separação das proteínas presentes nas células J774-G8 foi feita através da técnica de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Os géis foram preparados em duplicatas, em placas de 1,5 mm

de espessura. O gel de empacotamento (*stacking gel*) foi feito na concentração de 4% e o gel de corrida (*running gel*) na concentração a 10% em todos os tipos celulares estudados. As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris-Cl, 125 mM (Vetec); SDS, 4% (GE); glicerol, 20% (GE); β -mercaptoetanol, 10% (GE); azul de bromofenol, 0,4%; pH 6,8 (Sigma)) e mantidas à temperatura ambiente por cerca de 1 hora antes de sua aplicação no gel. A corrida eletroforética foi realizada na voltagem constante de 100 mV por 2 horas (sistema BIO-RAD) (Fonte de eletroforese GSR, Modelo 200 STD).

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 360 mA por 1 hora por sistema semi-seco (Transiluminador UV Biosystem, modelo TFP-L/ WL, França). Em seguida, o gel foi incubado em tampão TBS (*Tris-buffered saline*), contendo leite em pó desnatado Molico^R a 5%, e Tween 20 a 0.5% (Sigma)) por 30 min, seguindo-se de lavagens com TBS-T (contendo tampão TBS e Tween 20 a 0,5% (Sigma)) por três vezes durante 10 minutos por vez.

O papel de nitrocelulose foi incubado por 17 horas a 4°C com anticorpo policlonal produzido em coelho imunizado com peptídeo sintético correspondente à sequência de aminoácidos 362-382 de humanos (*Anti-connexin 43/ GJA1 antibody* (ab11370), Abcam) diluído na proporção de 1:1000 em TBS (contendo leite em pó desnatado Molico^R a 3%). Após a incubação, o papel de nitrocelulose foi lavado com TBS-T como descrito anteriormente sendo, logo depois, incubado com anticorpo secundário anti rabbit conjugado HRP diluído na proporção de 1:5000 em TBS (contendo leite em pó desnatado Molico^R a 3%) por 2h.

Após nova lavagem com TBS-T, foi feita incubação com solução de ECL (substrato de peroxidase para quimioluminescência) acrescida ao peróxido de hidrogênio, por 10 minutos para revelação no sistema *ChemiDoc MP imaging system* BIO-RAD, e avaliado pelo programa Image lab 5.1.

4.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células foram fixadas com formaldeído 4% (Vetec) durante 1h em temperatura ambiente. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS-TRITON X-100R (Sigma) em uma concentração de 1%, três vezes durante 10 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 anticorpo policlonal anti-Cx43 (*Anti-connexin 43/ GJA1 antibody* (ab11370), Abcam) em uma diluição de 1:100 por 24h (*over night*) a 4 °C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, três vezes durante 10 minutos e incubadas com anticorpo secundário ALEXA 488 (*Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488* (A-11008), ThermoFisher) na diluição de 1:400 por 2 horas em estufa de CO₂ (Cuture CO₂ Incubator, modelo CCL-170B-8, Sigapore) a 37 °C. Após a lavagem com PBS, como descrito anteriormente, as células foram incubadas com o marcador de citoesqueleto Faloidina (F-actina) 546 (*Alexa Fluor® 546 phalloidin* (A22283), *Life Technology*) em uma diluição de 1:400, por 2 horas em estufa de CO₂ (Cuture CO₂ Incubator, modelo CCL-170B-8, Sigapore) a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, três vezes durante 10 minutos e, após as lavagens, as lamínulas foram marcadas com DAPI (*4',6 diamidino-2-phenylindole*) para revelar o núcleo das células. Em seguida, as lamínulas foram montadas sobre lâminas que continham uma solução de 10 µl de Prolong gold^R (Invitrogen), para diminuição do tempo de decaimento da fluorescência.

As lâminas foram observadas no microscópio confocal LSM 710 QUASAR (Carl ZEISS, Oberkochen, Alemanha).

4.5. 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 microeletrodos com resistência em torno de 5mΩ contendo solução a 5% (P/V) de *Lucifer Yellow CH* em 150 mM de LiCl (Cloreto de Lítio) (Sigma), e com o corante Rodamina Dextran (PM: 40 KDa, SIGMA), na concentração de 2,5% (P/V) em 150 mM de LiCl (cloreto de lítio) (Sigma). Os dois corantes estavam presentes no mesmo microeletrodo.

Os campos injetados foram fotografados com uma máquina 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*), Alemanha), excitadas com iluminação por lâmpada de mercúrio de alta pressão, HBO 50W, ($\lambda = 490\text{nm}$) sendo a emissão monitorada utilizando um conjunto de filtros de emissão para fluorescência de fluoresceína ($\lambda = 525\text{nm}$) e de rodamina ($\lambda = 580\text{nm}$).

4.6. Análise estatística

A análise estatística foi plotada no programa *GraphPad Prism 6*. Os testes Qui-quadrado e One Way Anova foram utilizados para a análise inferencial em um nível de significância inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Tratamento com fatores pró-imune inflamatórios: crescimento celular e aspectos morfológicos

A **Figura 15** apresenta o gráfico comparativo gerado a partir da análise do número de grumos observados durante o tratamento com os fatores pró-imune inflamatórios em todos os tempos de tratamento. Observou-se que a maior quantidade de grumos em cultura esteve presente no tempo de 48h após o tratamento com IFN- γ , decaindo no 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 tempos 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 diminuiriam em número, mas apresentaram um volume de concentração celular maior.

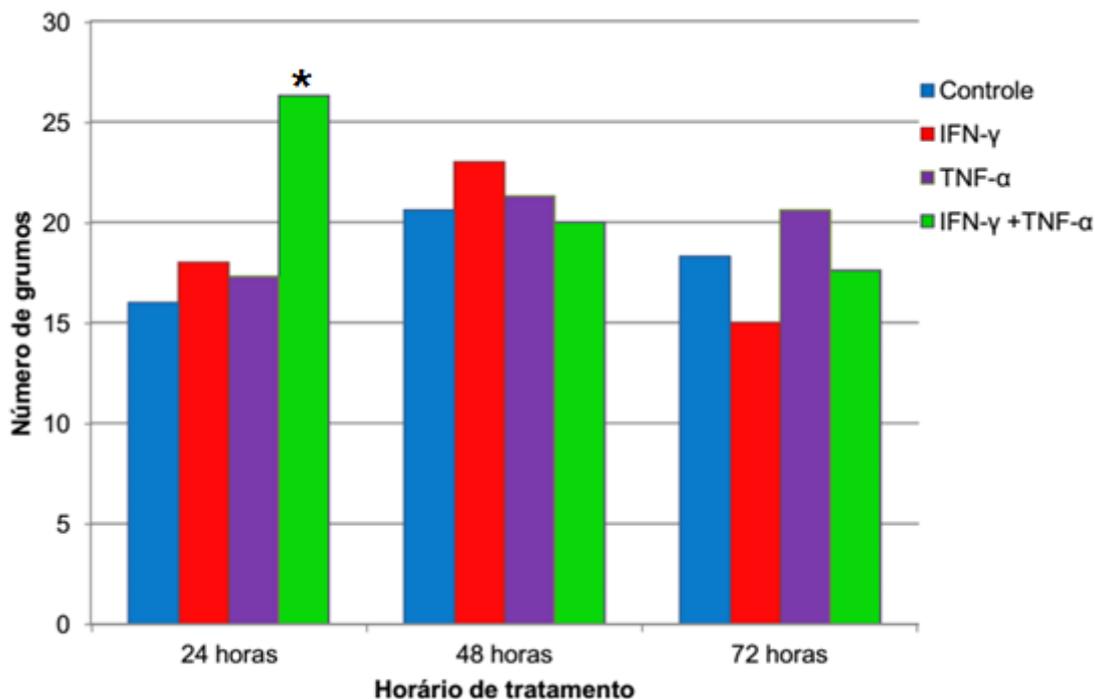


FIGURA 15: Gráfico comparativo do número de grumos celulares nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 controle e após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ , em períodos de 24, 48 e 72 horas. Foi possível observar grumos celulares com um maior número de células em 24 horas de incubação com os fatores combinados. Desvio Padrão: 3,475. Estatisticamente $P < 0,05$ por T de student. Total de experimentos: 3.

A Linhagem Macrofágica J774-G8 foi submetida ao tratamento com fatores pró-imune inflamatórios isolados (TNF- α e IFN- γ) e combinados (TNF- α + IFN- γ) em uma concentração de 50 ng/mL para que pudéssemos analisar o perfil de comunicação juncional em um microambiente que reproduza a ativação macrofágica. Foram feitos tratamentos em tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação com os fatores.

No entanto, antes de fazer a análise funcional e morfológica da comunicação intercelular é imperativo estudar as possíveis mudanças que podem ocorrer na dinâmica de crescimento celular, que envolve a velocidade de crescimento e a morfologia das células quando tratadas ou em situação controle (sem tratamento).

Na **Figura 16** observam-se micrografias de contraste de fase do crescimento das células J774-G8 no tempo de 24 horas em culturas do grupo controle (**Figura 16 a**) e tratadas com: IFN- γ (**Figura 16 b**), TNF- α (**Figura 16 c**) e TNF- α + IFN- γ (**Figura 16 d**). Na **Figura 17** as micrografias de contraste de fase de células J774-

G8 foram obtidas com a incubação de 48 horas em grupos controle (**Figura 17 a**) e em culturas tratadas com: IFN- γ (**Figura 17 b**), TNF- α (**Figura 17 c**) e TNF- α + IFN- γ (**Figura 17 d**). Em 72 horas (**Figura 18**), observa-se o grupo controle (**Figura 16 a**) e os tratamentos com: IFN- γ (**Figura 18 b**), TNF- α (**Figura 18 c**) e TNF- α + IFN- γ (**Figura 18 d**). Todas as figuras foram realizadas em aumentos de 100X (objetiva de 10X), com o objetivo de indicar o crescimento celular.

Com base nos resultados obtidos, podemos observar por microscopia de contraste de fase que, em incubações envolvendo o período de 24 horas, as células J774-G8 apresentaram um considerável crescimento com a formação de grumos celulares após tratamento com TNF- α + IFN- γ , quando comparadas com as culturas que foram incubadas em tempos diferentes (48 e 72 horas). Este resultado pode indicar que a organização celular em grumos aponta para uma maior necessidade de troca de informações, uma vez que o ambiente está sendo ativado, mesmo que não tenha sido observado o microambiente completo.

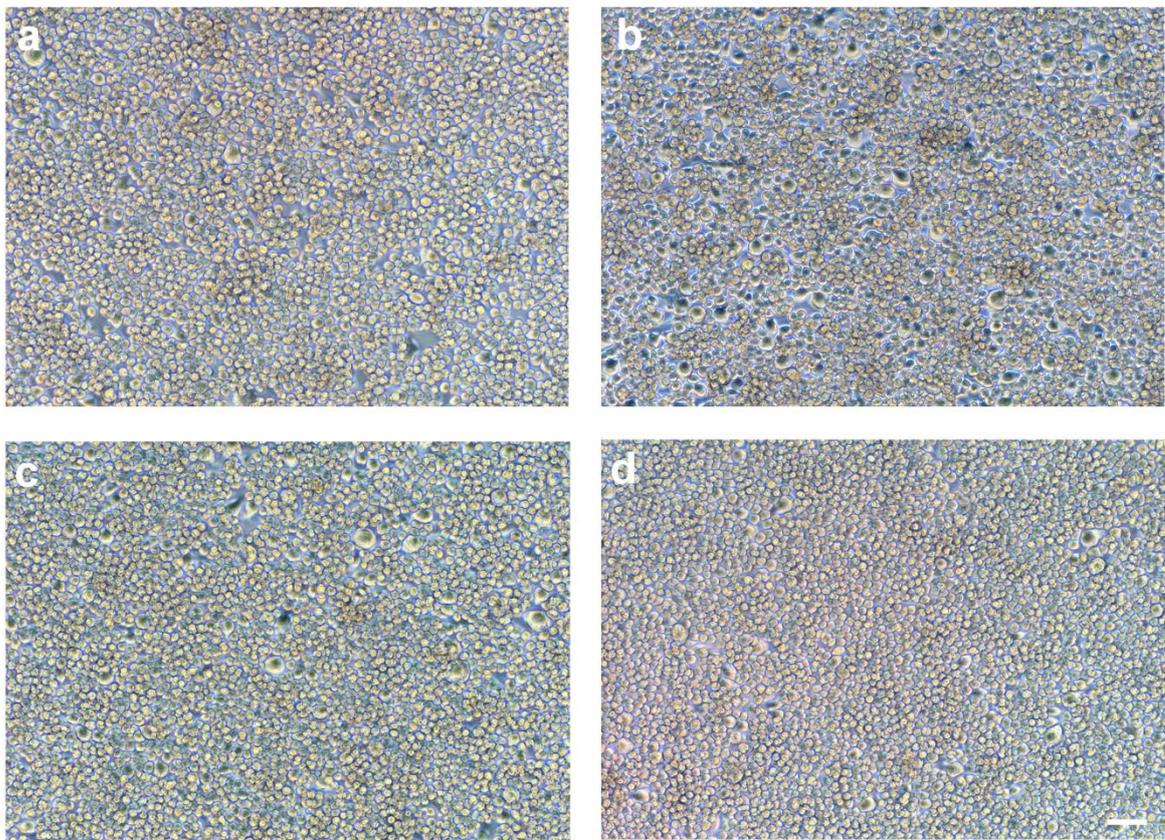


FIGURA 16: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Está sendo demonstrado o perfil de crescimento celular nos grupos controle **(a)** e após a incubação de 24 horas com os fatores: IFN- γ **(b)**, TNF- α **(c)** e TNF- α + IFN- γ **(d)**. Células J774-G8 não apresentaram alteração no crescimento celular. Aumentos de 100X (Objetiva de 10X). Barra de Calibração: 20 μ m

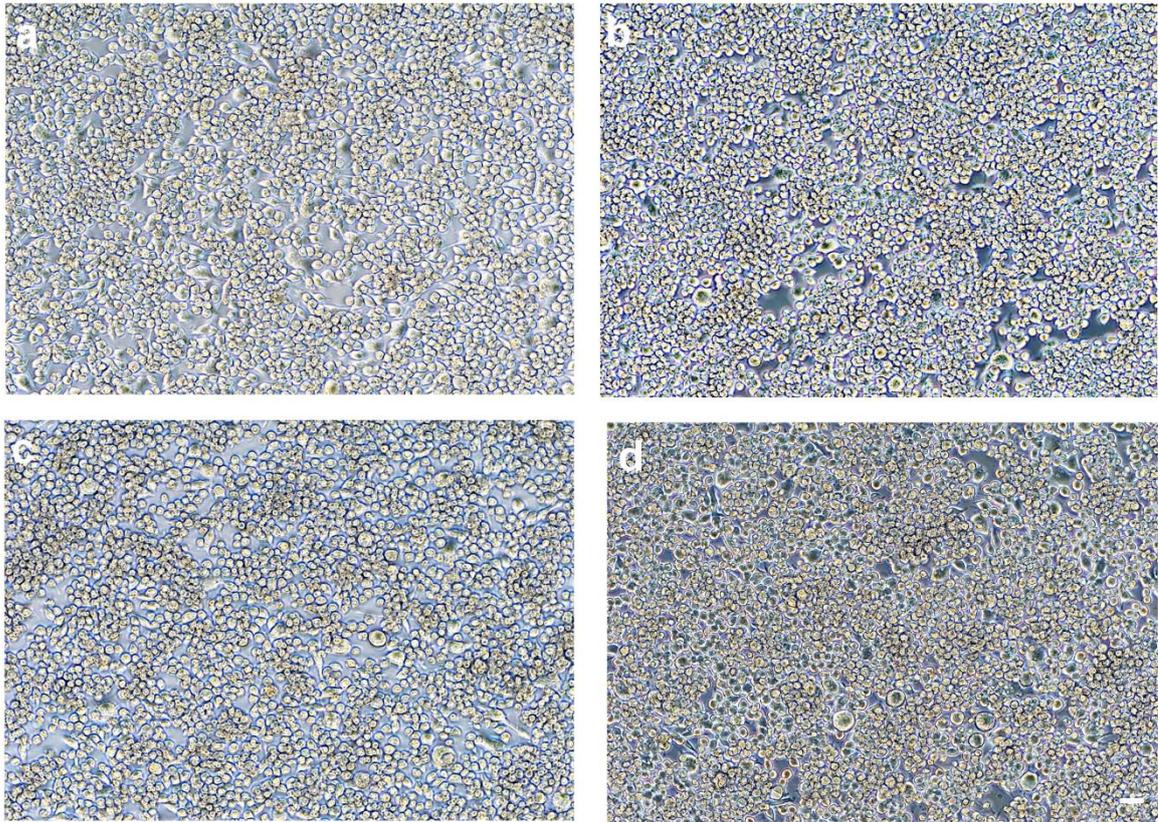


FIGURA 17: Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 por contraste de fase das culturas após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Perfil de crescimento celular nos grupos controle **(a)** e após a incubação de 48 horas com os fatores: IFN- γ **(b)**, TNF- α **(c)** e TNF- α + IFN- γ **(d)**. J774-G8 apresentaram um considerável crescimento com a formação de grupos celulares após tratamento com TNF- α + IFN- γ , Aumentos de 100X (Objetiva de 10X). Barra de Calibração: 20 μ m.

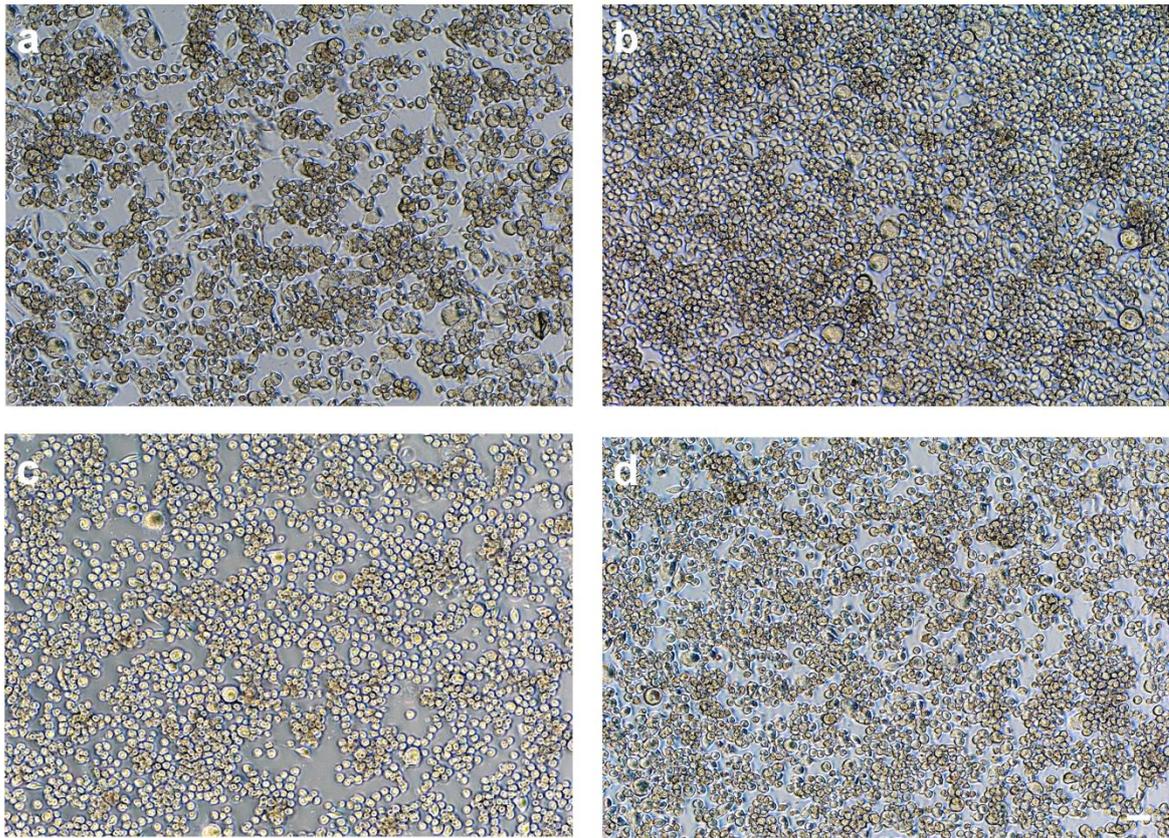


FIGURA 18: Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 por contraste de fase das culturas após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Perfil de crescimento celular nos grupos controle **(a)** e após a incubação de 72 horas com os fatores: IFN- γ **(b)**, TNF- α **(c)** e TNF- α + IFN- γ **(d)**. Células J774-G8 apresentaram um decréscimo de formação de grumos neste horário. Aumentos de 100X (Objetiva de 10X). Barra de Calibração: 20 μ m.

Na **Figura 19** observa-se por contraste de fase a morfologia das células J774-G8 nos grupos controle **(Figura 19 A)** e tratados com IFN- γ **(Figura 19 B)**, TNF- α **(Figura 19 C)** e TNF- α + IFN- γ **(Figura 19 D)** após a incubação das culturas por 24 horas. O mesmo foi aplicado à **Figura 20** e à **Figura 21** mostrando o grupo controle **(Figura 20 e 21 A)** e tratados com IFN- γ **(Figura 20 e 21 B)**, TNF- α **(Figura 20 e 21 C)** e TNF- α + IFN- γ **(Figuras 20 e 21 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 grumos celulares com mais detalhes. Foram utilizados aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

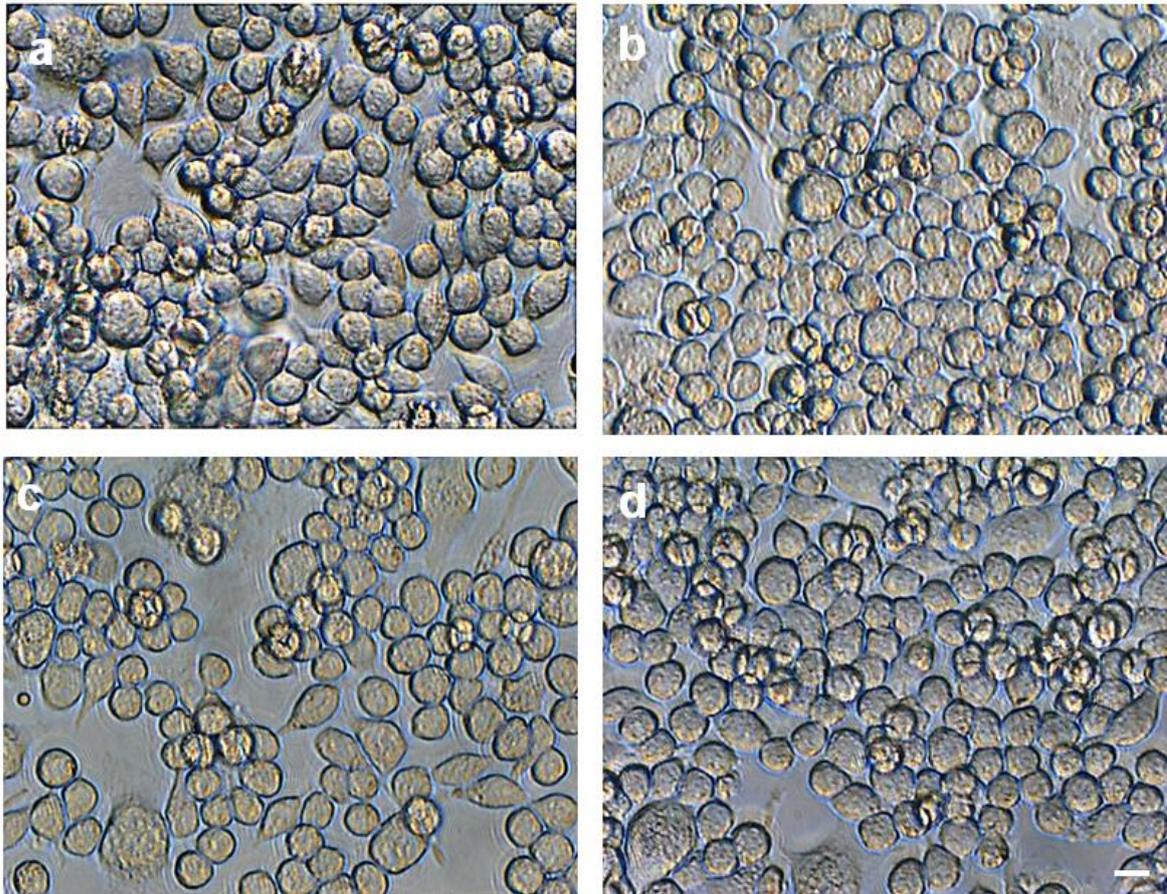


FIGURA 19: Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 em contraste de fase após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Perfil morfológico nos grupos controle **(a)** e após a incubação de 24 horas com os fatores: IFN- γ **(b)**, TNF- α **(c)** e TNF- α + IFN- γ **(d)**. Células J774-G8 não apresentaram alteração em sua morfologia. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X). Barra de Calibração: 20 μ m

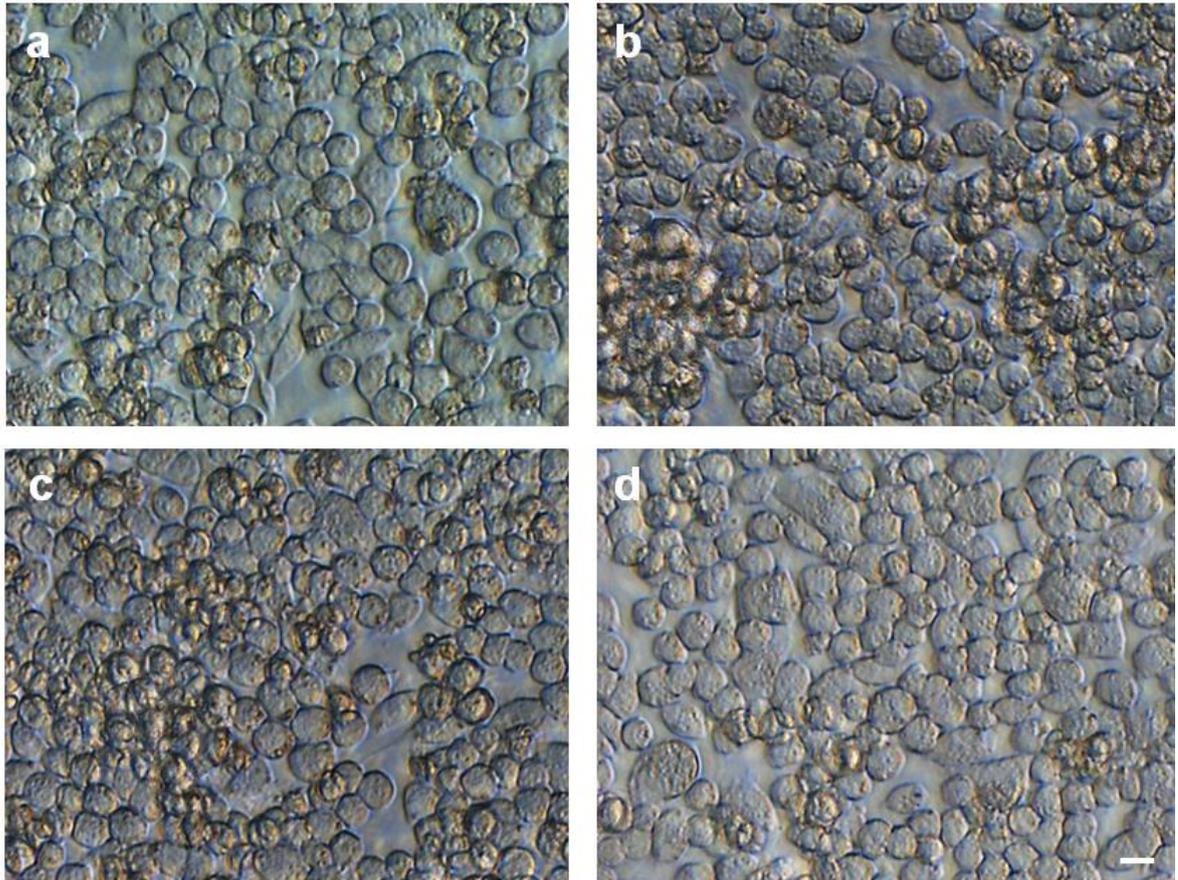


FIGURA 20: Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 em contraste de fase após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Perfil morfológico nos grupos controle **(a)** e após a incubação de 48 horas com os fatores: IFN- γ **(b)**, TNF- α **(c)** e TNF- α + IFN- γ **(d)**. Células J774-G8 não apresentaram alteração em sua morfologia, porém observa-se um acentuado aumento na formação de grumos celulares. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X). Barra de Calibração: 20 μ m

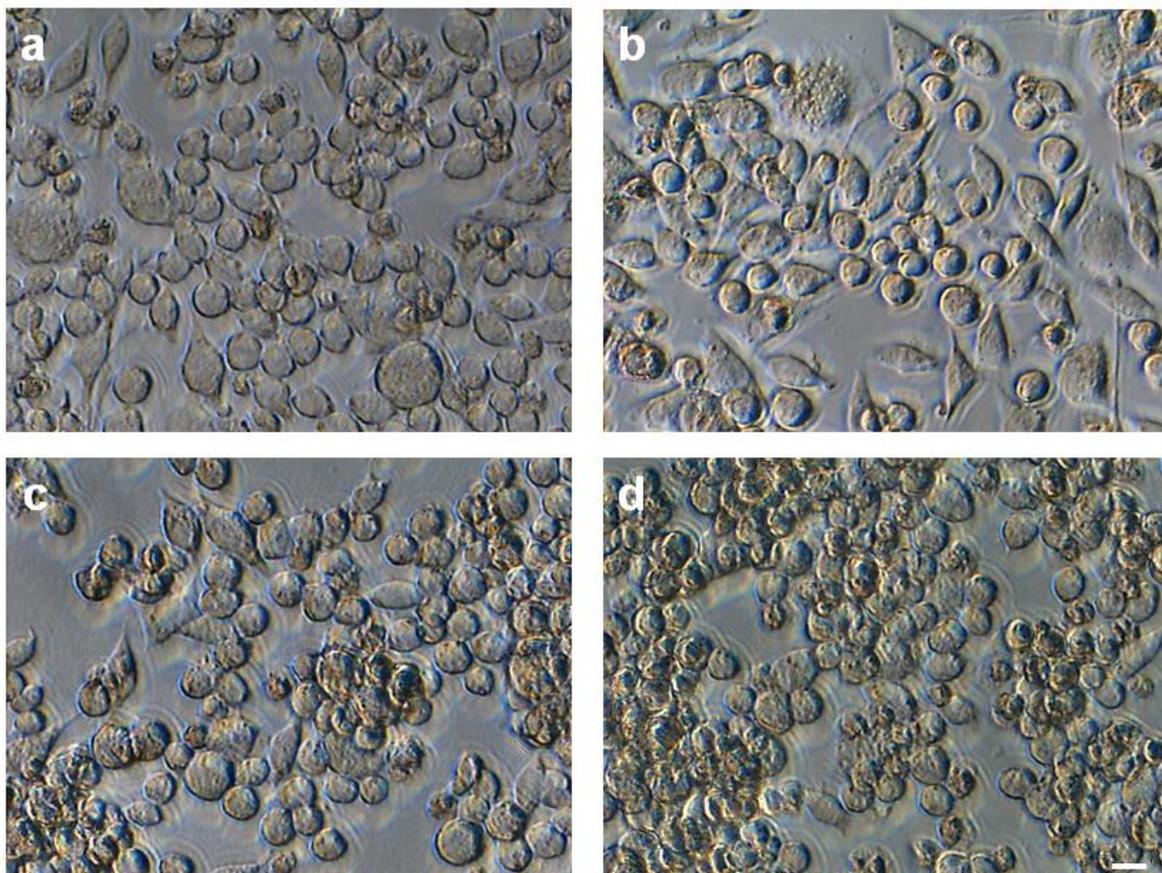


FIGURA 21: Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 em contraste de fase após o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. Perfil morfológico nos grupos controle **(a)** e após a incubação de 72 horas com os fatores: IFN- γ **(b)**, TNF- α **(c)** e TNF- α + IFN- γ **(d)**. Células J774-G8 não apresentaram alteração em sua morfologia. Nota-se um decréscimo no crescimento e sobrevivência das células. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X). Barra de Calibração: 20 μ m

5.2. Tratamento com fatores pró-imune inflamatórios: comunicação celular

Os gráficos presentes nas **Figuras 22, 23 e 24** representam, respectivamente, o acoplamento celular nos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação com os fatores pró-imune inflamatórios corroborando os achados destacados nas micrografias.

Com 24 horas de incubação, utilizando os fatores pró-imune inflamatórios **(Figura 22)**, destacamos o aumento no acoplamento das células à célula injetada com o corante, quando comparadas com as células controle. Este aumento ocorre, 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 a 8 células.

Comunicação Celular J774-G8 (24h)

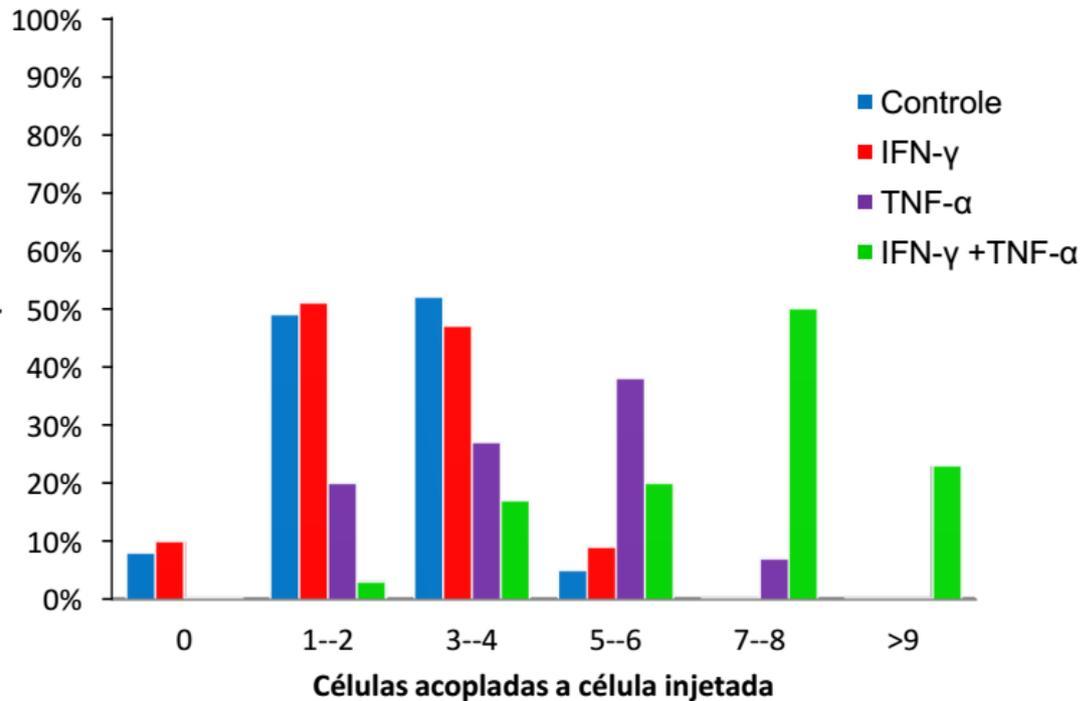


FIGURA 22: O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 controle ou incubadas por 24 horas com IFN- γ , TNF- α ou TNF- α + IFN- γ , injetadas com o corante *Lucifer Yellow*. O grau de acoplamento foi quantificado em seis classes: (0) nenhuma célula acoplada à célula injetada; (1--2) 1 a 2 células acopladas a célula injetada com o corante; (3--4) de 3 a 4 células acopladas à célula injetada; (5--6) 5 a 6 células acopladas à célula injetada; (7--8) 7 a 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 χ^2 .

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 23**).

Comunicação Celular J774-G8 (48h)

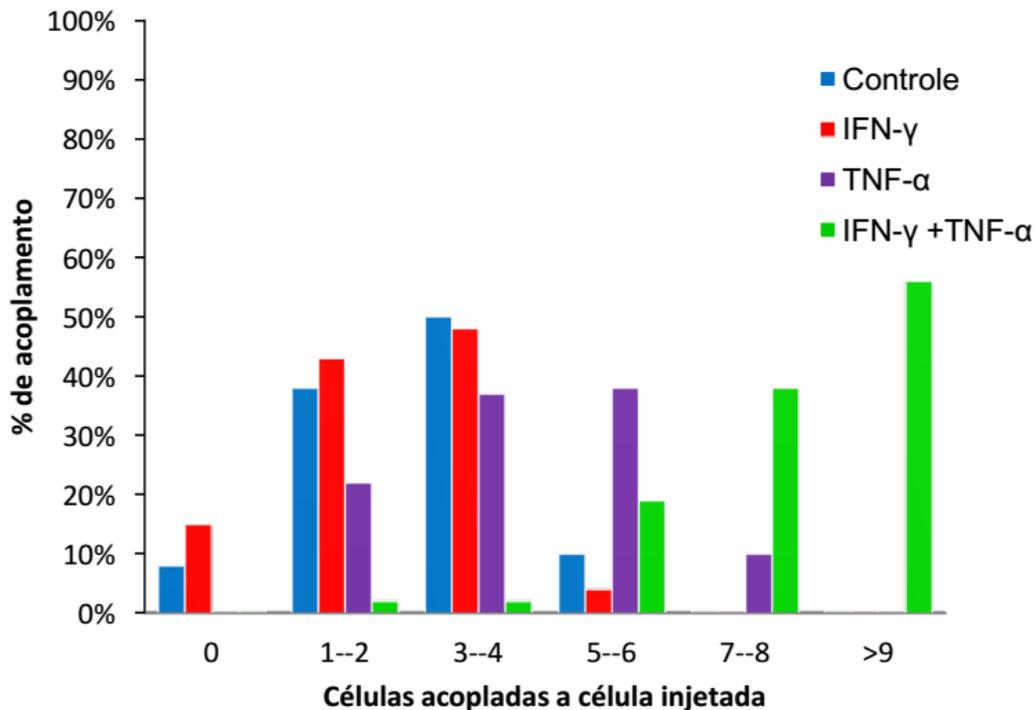


FIGURA 23: O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 controle ou incubadas por 48 horas com IFN- γ , TNF- α ou TNF- α + IFN- γ , injetadas com o corante *Lucifer Yellow*. O grau de acoplamento foi quantificado em seis classes: (0) nenhuma célula acoplada à célula injetada; (1---2) 1 a 2 células acopladas à célula injetada com o corante; (3---4) de 3 a 4 células acopladas à célula injetada; (5---6) 5 a 6 células acopladas à célula injetada; (7---8) 7 a 8 células acopladas à célula injetada; (>10) 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 χ^2 .

Em 72 horas de incubação com os fatores pró-imune inflamatórios, o índice de acoplamento celular começou a sofrer um decréscimo, principalmente quando observados a quantidade de células acopladas à célula injetada nas classes de 7 a 8 células (20%), ou mais de 9 células (5%) (**Figura 24**).

Comunicação celular J774-G8 (72h)

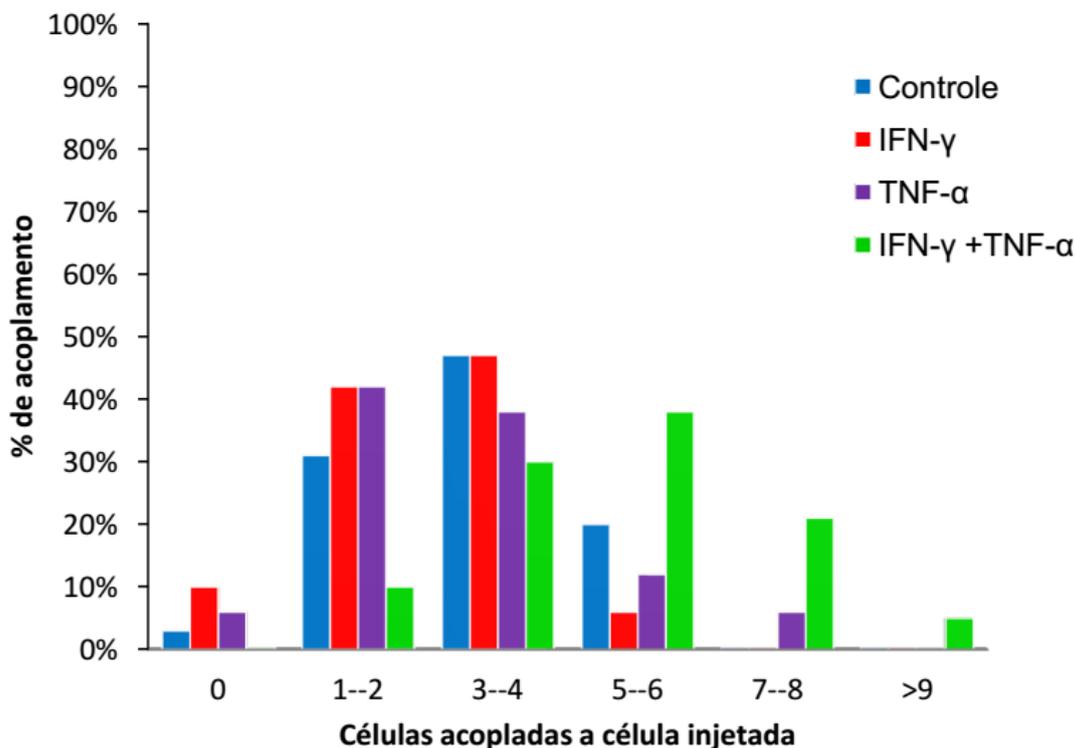


FIGURA 24: O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 controle ou incubadas por 48 horas com IFN- γ , TNF- α ou TNF- α + IFN- γ , injetadas com o corante *Lucifer Yellow*. O grau de acoplamento foi quantificado em seis classes: (0) nenhuma célula acoplada à célula injetada; (1---2) 1 a 2 células acopladas à célula injetada com o corante; (3---4) de 3 a 4 células acopladas à célula injetada; (5---6) 5 a 6 células acopladas à célula injetada; (7---8) 7 a 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 X2.

A fim 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, neste estudo, injetamos o corante “Lucifer Yellow” (peso molecular: 457.2 Da) nas células J774-G8.

A **Figura 25** ilustra microinjeções de corante realizadas em linhagens macrofágicas J774-G8 após 48 horas de tratamento. As células controle, (**Figuras**

25 A – B), encontram-se acopladas e, quando tratadas com fatores pró-imuno inflamatórios isolados, permanecem com o mesmo grau de acoplamento, como pode ser observado nas **Figuras 25 C – F)**. No entanto, após o tratamento com os fatores de forma conjugada (TNF- α + IFN- γ), observamos uma ordem crescente de células acopladas à célula injetada, como demonstrado nas micrografias representadas pelas **Figuras 25 G - H)**.

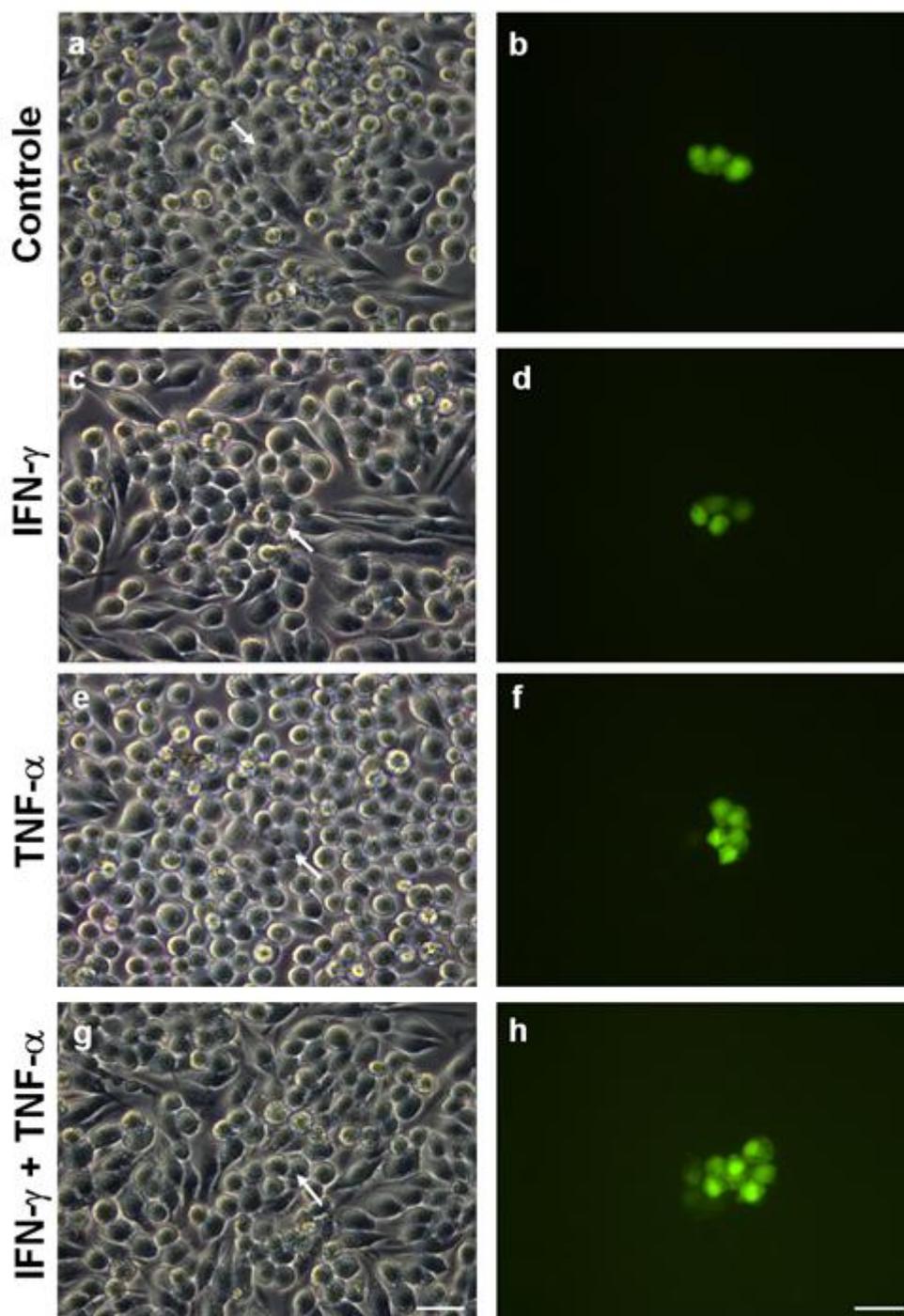


FIGURA 25: Micrografias de contraste de fase à esquerda (**a, c, e e g**) e fluorescência à direita (**b, d, f e h**) de culturas da linhagem celular macrofágica J774-G8 controle ou incubadas IFN- γ , TNF- α ou TNF- α + IFN- γ , no período de 48h, injetadas com o corante “Lucifer Yellow”. Podemos observar 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: 50 μ m. Total de experimentos: 3

5.3. Infecção com o *T. cruzi*: crescimento celular e aspectos morfológicos

A **Figura 26** apresenta o gráfico comparativo gerado a partir da análise do número de grumos observados durante a infecção com *T. cruzi* nos períodos de 24h, 48h e 72h. Observou-se que a maior quantidade de grumos em cultura esteve presente no tempo de 24h após a infecção com o parasito. Os grumos celulares diminuíram significativamente no período de 72h.

A infecção com *T. cruzi* apresentou uma diminuição na formação de grumos em 72h, o que pode ser explicado pela diminuição do acoplamento celular o aumento na parasitemia e a diminuição no crescimento e sobrevivência celular.

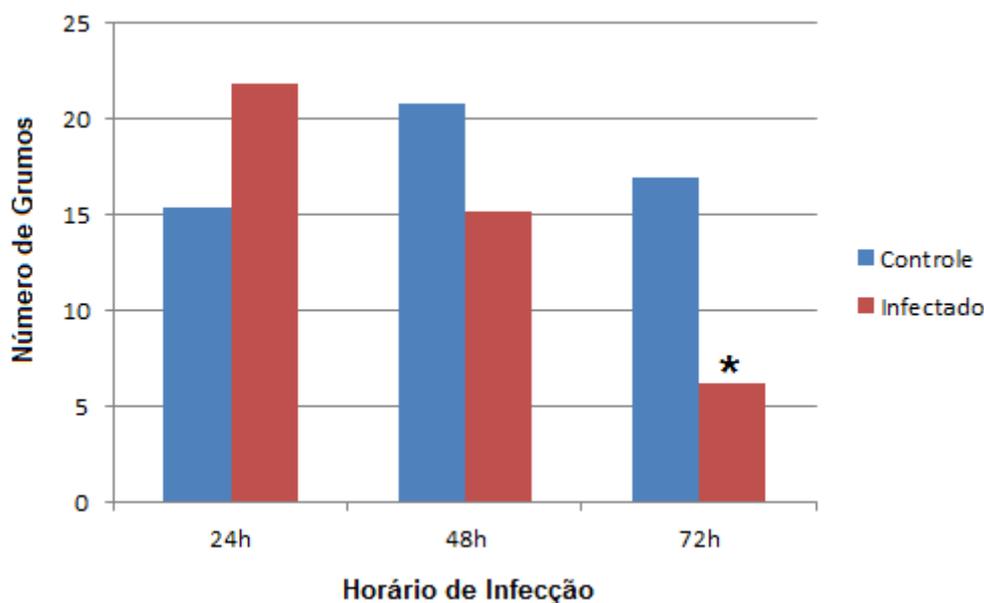


FIGURA 26: Gráfico comparativo do número de grumos celulares nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 controle e após infecção com *T. cruzi*, em períodos de 24, 48 e 72 horas. Foi possível observar grumos celulares com um menor número de células em 72 horas de incubação com *T. cruzi*. Desvio Padrão: 5,562. Estatisticamente $P < 0,05$ por T de student. Total de experimentos: 2.

A linhagem macrofágica J774-G8 foi infectada na proporção de 1:5 parasitas por célula a fim de se analisar como o perfil de comunicação juncional é alterado no microambiente de infecção aguda gerado pelo parasita *T. cruzi* durante 24, 48 e 72 horas. É possível observar as mudanças celulares que ocorrem no processo de infecção, envolvendo a manutenção da sobrevivência

do parasita no meio intracelular, comparadas com as células controle (sem parasita).

A **Figura 27** mostra por contraste de fase o processo de infecção das células J774-G8 no tempo de 24, 48 e 72 horas (**Figura 27 B, 27 C e 27 D**, respectivamente) em relação ao grupo controle (**Figura 27 A**). 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 tempos 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 com os outros tempos de interação (24 e 48 horas) e o controle, pois as células infectadas foram lisadas pelo parasita aumentando assim a quantidade deste livre em cultura.

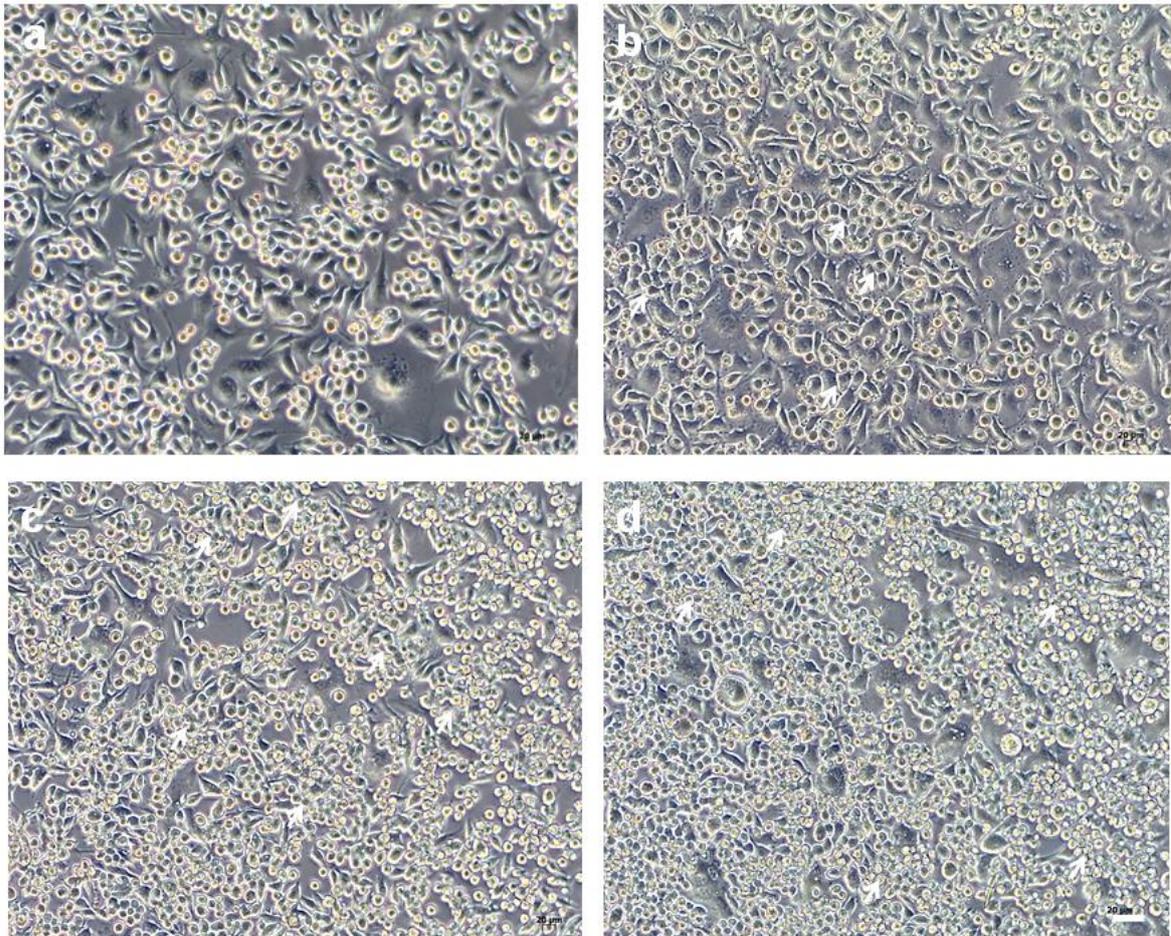


Figura 27: Microscopia óptica (contraste de fase) utilizando células da Linhagem Macrofágica J774–G8 controle **(a)** e infectadas com *T. cruzi* em 24h **(b)**, 48h **(c)** e 72h **(d)**. Na proporção de cinco parasitas por célula. É possível observar a alteração do comportamento das células infectadas em relação à sua ocupação do microambiente, formando agregados celulares (setas). O aumento do tempo de infecção diminui a quantidade de grumos celulares quando comparadas com as células controle. Aumentos de 100X (Objetiva de 10X). Barra de calibração 20µm.

A **Figura 28**, por contraste de fase, mostra a morfologia das células J774-G8 nos grupos controle **(Figura 28 A)** e infectado **(Figura 28 B, 28 C e 28 D)**, 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, 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).

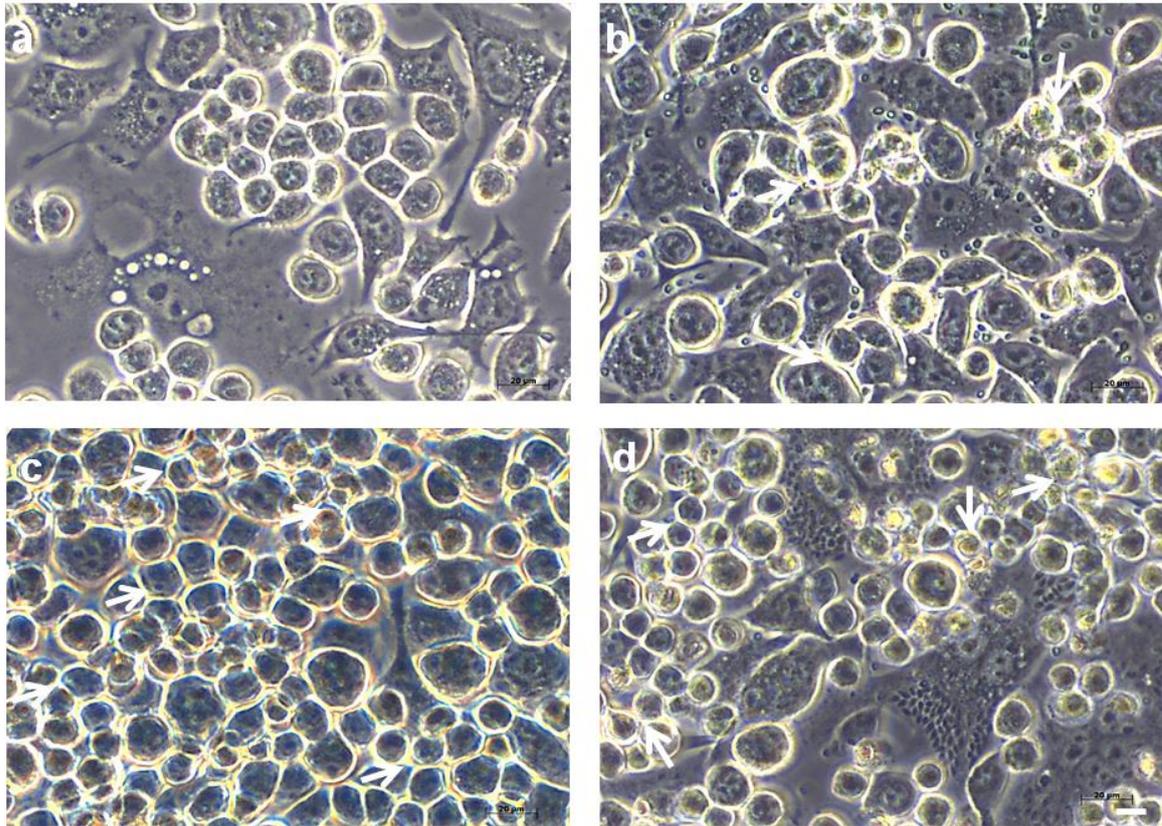


Figura 28: Micrografias em microscopia óptica (contraste de fase) utilizando células da Linhagem Macrofágica J774–G8 controle **(a)** e infectadas com *T. cruzi* em 24h **(b)**, 48h **(c)** e 72h **(d)** na proporção de cinco parasitas por célula. Alterações morfológicas nas células J774-G8 são evidentes, como pode ser observado nas fotos **b**, **c** e **d** (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).

5.4. Infecção com o *T. cruzi*: expressão da conexina 43

A expressão dos níveis proteicos da conexina 43 foi analisada através de ensaios de imunoeletrotransferência utilizando células J774-G8 controle e infectadas nos tempos de 24 e 48 e 72 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 naquelas infectadas em todos os tempos de incubação analisados no experimento (24, 48 e 72horas), como destacado na **Figura 29**.

A banda representando a interação com o parasita em um período de incubação de 24 horas apresentou uma menor expressão de Cx43 do que nas células controle (não infectadas). Porém, a banda que representa 48

horas de infecção, revelou uma maior expressão da Cx43 em relação às células controle e a infecção de 24h (**Figura 29**).

Entretanto, em 72h, a banda apresentou uma menor expressão de Cx43 em relação à 48h. Todavia, teve sua expressão maior em relação às células controle e 24h de infecção (**Figura 29**).

Os dados densitométricos confirmaram os achados visíveis representados na membrana marcada com o anticorpo para Conexina 43 (**Figura 30**).

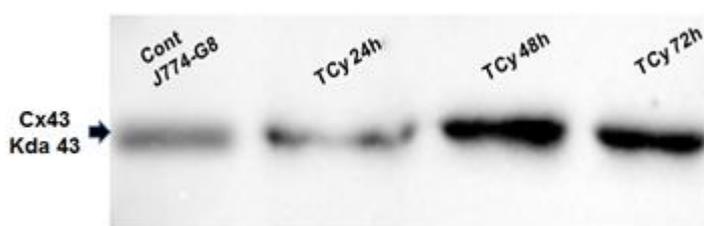


Figura 29: Experimentos de *Western Blot* de culturas de linhagem de células macrofágicas J774-G8 controle (não-infectada) ou infectada (período de 24, 48 e 72 horas, respectivamente). A marcação em 43 kDa: utilização do anticorpo policlonal para Conexina 43. Quantidades iguais de proteína foram carregadas no gel SDS-PAGE a 10%. O anticorpo anti-Cx43 detectou a presença da proteína Cx43 nas células J774-G8 controle e nas células J774-G8 infectadas com incubação de 24, 48 e 72 horas. Nota-se uma diminuição da expressão da Cx43 em relação ao controle, nas células J774-G8 infectadas em 24 horas, no entanto é possível notar um aumento da expressão de Cx43 em 48 horas se comparado ao horário de 24 horas. Em 72 horas, novamente, há uma diminuição da expressão de Cx43 se comparado a 48 horas. Porém, ainda maior em relação ao controle e 24h horas de infecção.

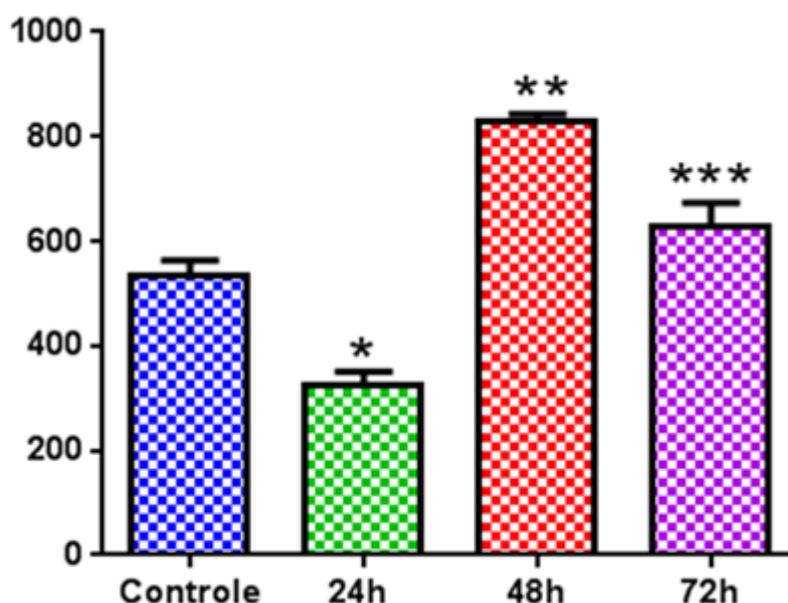


Figura 30: Gráfico densitométrico das bandas de *Western blot* de culturas das células J774-G8 controle e infectadas nos tempos de 24 e 48 e 72 horas. É possível notar uma diminuição da expressão da Cx43 em 24 horas de infecção e um aumento significativo desta proteína em 48 horas em relação ao controle. Em 72 horas há uma diminuição da expressão de Cx43 se comparado a 48 horas. Porém, ainda maior em relação ao controle e 24h horas de infecção. $p < 0,0001$ *One Way Anova*. A barra indica o desvio padrão. Total de experimentos: 2.

5.5. Infecção com *T. cruzi*: localização da conexina 43 e interação com o citoesqueleto

A fim de avaliar a expressão da proteína Conexina 43 (Cx43) nos macrófagos de linhagem J774-G8, foram realizados experimentos de Imunofluorescência (**Figura 31**). Foi utilizado anticorpo anti-conexina 43 (verde) para observar se a Cx43 estaria sendo expressa na membrana plasmática das células e se estaria sendo expressa da mesma forma após infecção com o parasita *Trypanosoma cruzi*.

Simultaneamente, foi feita a marcação com o anticorpo F-actina conjugado a Faloidina (vermelho) que detecta filamentos de F-actina, a fim verificar a organização do citoesqueleto das células J774-G8, uma vez que as incubações com os fatores e a infecção com os parasitas podem alterar a organização celular. O núcleo foi marcado com o corante DAPI (azul). Ao analisar o experimento no sistema de microscopia confocal LSM710 Quasar,

podemos observar a marcação do núcleo das células com DAPI (**Figura 31 A**). Os resultados da **Figura 31 B** indicam a localização da Cx43 nas células J774-G8, que se encontram essencialmente na membrana plasmática, o que corrobora os dados de acoplamento dos experimentos de injeção de corantes (**Figura 25**).

Paralelamente, no mesmo experimento, foi feita a imunomarcação das células com o anticorpo F-actina conjugado a Faloidina demonstrando que os filamentos de actina estão distribuídos de forma uniforme pelas células J774-G8, sendo observados principalmente na membrana plasmática, podendo servir de ancoramento para outras proteínas (**Figura 31 C**). 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 31 D**, foi constatada a colocalização entre as duas proteínas Cx43 e marcação com Faloidina (pontos amarelos resultantes da interação colorimétrica do verde e do vermelho dos dois anticorpos), indicando que o citoesqueleto interage com proteínas que desempenham as mais diversas funções na membrana plasmática, como é o caso das conexinas, principalmente em células do sistema migratório.

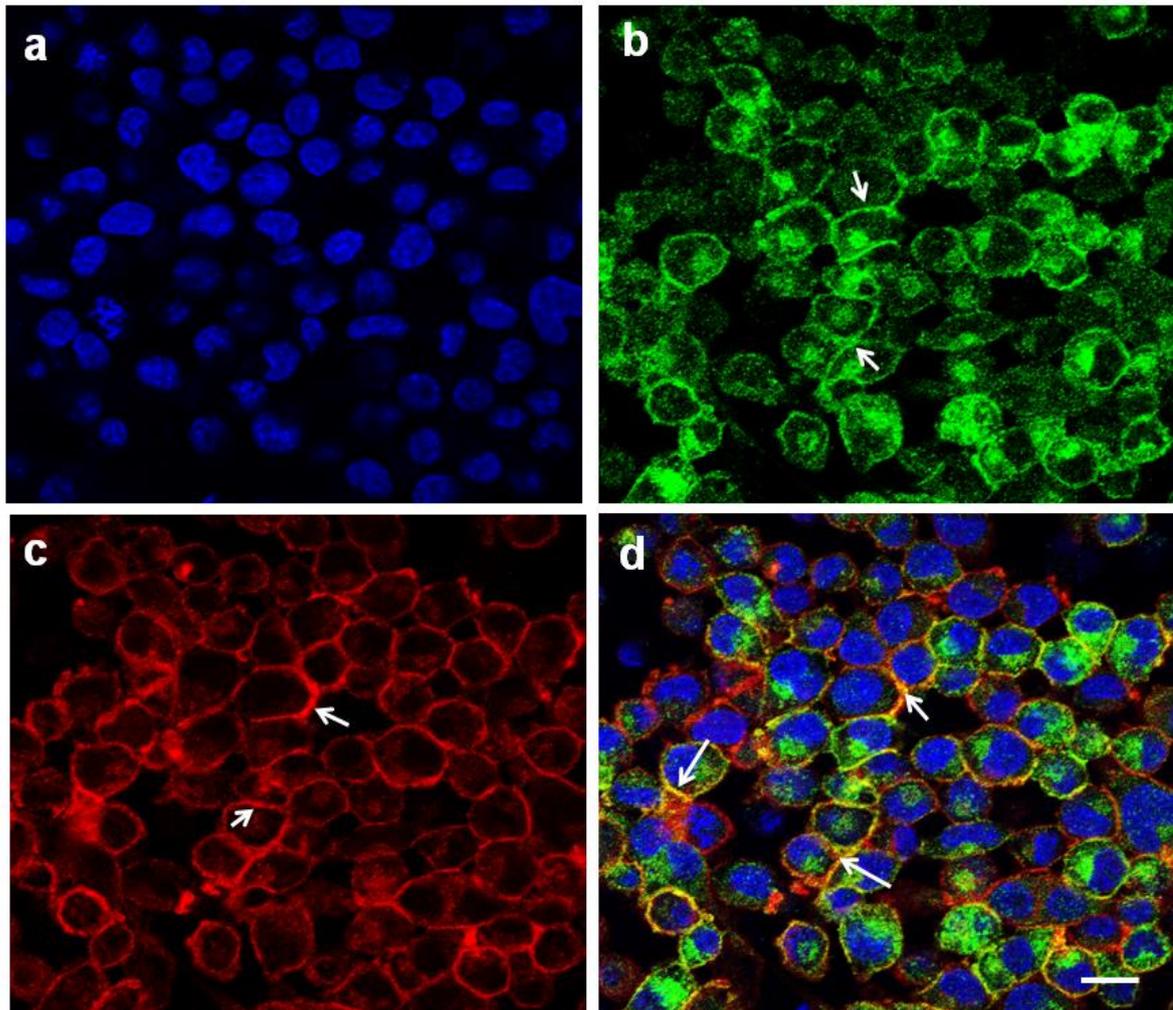


Figura 31: Imunofluorescência das células macrofágicas J774-G8 controle com Microscopia Confocal (LSM710, Zeiss, Germany), evidenciando a marcação para proteína Connexina 43 e Faloidina (marcador de filamentos de actina) em células de linhagem macrofágica J774-G8. A marcação específica para Cx43 (verde) e Faloidina (vermelho) pode ser observada na membrana plasmática das células (B e C, respectivamente). Em A podemos observar o núcleo das células marcado com o corante nuclear DAPI (azul). Na micrografia D é demonstrada a sobreposição de imagens, indicando uma possível co-localização entre as proteínas Cx43 e Actina (pontos destacados em amarelo). Barra de calibração: 50 μ m.

Experimentos de imunofluorescência também foram realizados em culturas de células infectadas com o parasita *T. cruzi*, na proporção de cinco 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 (**Figura 32**).

É possível observar na **Figura 32 A** a marcação do núcleo da célula J774-G8e a marcação do núcleo do protozoário pelo DAPI (azul) indicado pela seta.

Na **Figura 32 B** podemos destacar a ausência da marcação para conexina 43 na membrana, bem como a marcação para Faloidina (**Figura 32 C**) que mostra um sensível decréscimo inferindo uma possível desorganização de seu citoesqueleto, sugerindo que haveria uma ligação entre o citoesqueleto e a conexina 43 nas células de linhagem macrofágica J774-G8.

Na **Figura 32 D**, podemos observar a marcação da conexina 43 (verde) no citoplasma, porém, nestas mesmas células não há marcação de faloidina (vermelho) indicando que estas marcações não estão co-localizadas como demonstrado no controle, indicando que a infecção com o *T. cruzi* poderia alterar a organização do citoesqueleto.

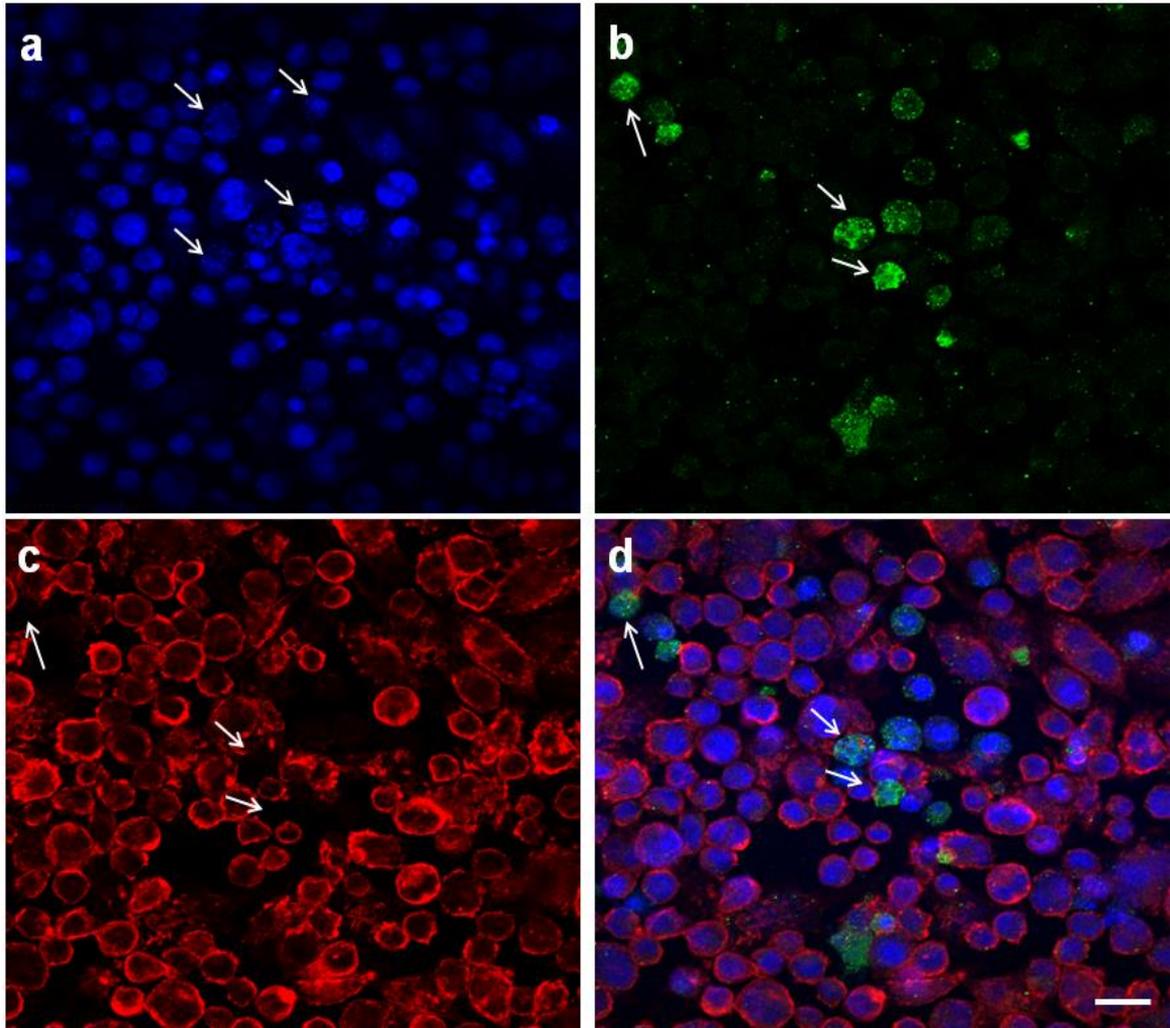


Figura 32: Imunofluorescência das células macrofágicas J774-G8 por Microscopia Confocal (LSM710, Zeiss, Germany). As setas A indicam que há infecção com *T. cruzi*. B -C: marcação para Cx43 (verde) e F-actina (Faloidina – vermelho) não estão presentes na membrana plasmática das células J774-G8. A marcação para Cx 43 encontra-se no citoplasma. D: não há co-localização entre Cx43 e F-actina como demonstrado no controle. As células que possuem marcação para Cx 43 no citoplasma, não possuem marcação para F-actina. Barra de calibração: 50 μ m

6. DISCUSSÃO

6.1. fatores pró-imune inflamatórios

As conexinas constituem uma família de proteínas transmembranares envolvidas na formação de junções comunicantes que são canais que permitem a passagem de íons, segundos mensageiros e moléculas pequenas de até 1kDa entre células adjacentes (SUN et al., 2014).

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, 2000).

A presença deste tipo de comunicação intercelular em macrófagos pode ter uma grande importância fisiológica podendo mediar reações imuno-inflamatórias através da transmissão e recepção de sinais, que podem envolver as junções comunicantes (OVIEDO-ORTA and EVANS, 2004; EUGENIN et al., 2003).

GARCIA-DORADO et al. (2004) afirmaram que, sob condições patológicas, as junções comunicantes podem expandir a lesão celular / morte celular para as células saudáveis. Por outro lado, as junções comunicantes podem, também, agir de forma protetora, fornecendo nutrientes e metabólitos essenciais, evitando lesões ou morte de células vizinhas saudáveis (DECROCK et al., 2009).

Estudos feito por EUGENIN et al. (2001) apontaram que utilizando células de microglia (macrófagos do Sistema Nervoso Central) procedentes de lesões, demonstraram que as junções comunicantes estavam presentes e funcionais, porém somente quando as culturas eram incubadas com interferon- γ + TNF- α + lipopolissacarídeo (LPS).

No infarto cardíaco, a isquemia desencadeia uma diminuição na comunicação juncional como resultado de acidose, aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e níveis de fosforilação e nitrosilação alterados. Isso, juntamente com alterações em outros canais iônicos, leva a uma condução de impulso elétrico retardada e aumento do risco de arritmias (CASCIO et al., 2005; DHEIN, 2006; DHEIN et al., 2014).

O papel das conexinas em diversas situações fisiológicas e patológicas necessita, ainda, de muitos esclarecimentos. Portanto, no presente trabalho, aprofundamos os estudos relacionados à comunicação juncional em macrófagos e células de linhagem macrofágica J774, e que tiveram início em trabalhos do nosso

grupo em 2004 (FORTES et al.), abordando a presença e a funcionalidade das junções comunicantes.

Neste estudo, buscamos entender, inicialmente, como a Cx43 poderia estar sendo modulada, *in vitro*, em um ambiente em que há um estímulo inflamatório, visto que existem várias situações em que os macrófagos são ativados por várias substâncias endógenas e em concentrações variáveis.

O crescimento das células macrofágicas J774-G8 em um microambiente de estímulo inflamatório foi analisado nos experimentos (**Figuras 16 - 18**) que demonstraram que, de forma combinada (TNF- α + IFN- γ) os fatores pró-imune inflamatórios são capazes de induzir uma reorganização das células em cultura. Este fato pode ser corroborado com o gráfico presente na **Figura 15**, 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, sugerindo que a organização celular em grumos pode 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 e que irá retroalimentar a ativação macrofágica (ADAMS and HAMILTON, 1984; ABBAS et al, 2011).

Nas **Figuras 19 a 21** observamos que não houve alterações morfológicas significativas das células J774-G8 em todos os tempos de incubação com os fatores pró-imune inflamatórios, sendo possível observar a formação dos grumos celulares com mais detalhes.

Além das análises de crescimento celular e do perfil morfológico, foram realizadas análises funcionais com injeção de corantes, a fim de avaliar funcionalmente as junções comunicantes que estão presentes em células macrofágicas. 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 (**Figura 22**), e corroborado estatisticamente nas **Figuras 22 a 24**, 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. A **Figura 25H** mostra o aumento da

comunicação juncional em incubações de células com fatores combinados (TNF- α + IFN- γ) por 48 horas. É possível observar no gráfico da **Figura 23** um percentual de mais 50% das células injetadas acopladas com mais de 9 células o que poderia estar associado ao conjunto de ações que tentam reproduzir o processo inflamatório agudo, uma vez que é necessário uma constante troca de informações para que o processo inflamatório agudo consiga conter a lesão provocada pelo agente patogênico (CUZZOCREA, 2005).

Este dado corrobora com 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 (ADAMS and HAMILTON, 1984).

Em 2003, EUGENIN e colaboradores, mostraram que existe comunicação funcional entre junções comunicantes mediadas por Cx43 somente em macrófagos humanos tratados com TNF- α e IFN- γ , e a expressão de Cx43 foi detectada em macrófagos presentes nos locais de inflamação. No entanto, os resultados deste trabalho ratificaram os dados de FORTES et al. (2004), em que se afirma não ser necessário o pré-tratamento com fatores inflamatórios para que se tenha a formação de junções comunicantes funcionais em células de linhagem macrofágica J774-G8. Porém, conseguimos demonstrar que estas estruturas podem ter a sua atividade modulada em meio a um microambiente inflamatório quando tratadas com fatores pró-imune inflamatórios de forma isolada ou combinada e que, com base nestes resultados e em trabalhos utilizando estes tratamentos, observamos que o acoplamento celular foi regulado positivamente.

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 et al., 2005), assim como na hematopoiese (MONTECINO-RODRIGUEZ, 2000). Desta forma, a expressão das junções comunicantes em macrófagos modulada positivamente, poderia ser importante na resposta imunológica, por permitir a passagem de moléculas importantes para a ativação destas células em processos de infecção.

6.2. Infecção com *T. cruzi* x Comunicação celular

O protozoário parasita intracelular *Trypanosoma cruzi* causa Doença de Chagas em humanos (KOBBERLE, 1968; ANDRADE et al, 2014). A infecção é caracterizada por uma fase aguda resultando em parasitemia alta que se resolve após a aparição de uma resposta imune eficaz (CARDILLO et al., 2002). No entanto, a resposta imune induzida durante a infecção aguda não é suficiente para erradicar completamente o patógeno (ALBAREDA et al., 2006).

Na infecção chagásica, o parasita é capaz de prejudicar o funcionamento das células hospedeiras através de alterações na comunicação celular. Porém, estas junções não estão inteiramente caracterizadas no sistema imunológico e, em particular, nos macrófagos que participam da resposta inata. A caracterização morfológica e funcional das junções comunicantes em macrófagos tem sido alvo de estudo de diversos grupos, no entanto, seus mecanismos regulatórios ainda merecem esclarecimentos, principalmente diante de alterações patológicas, como nos processos infecto-inflamatórios causados pelo *T. cruzi*.

Diante desta situação, diversos estudos têm sido realizados a fim de se conseguir responder às ações do *T. cruzi*, bem como possíveis mecanismos envolvidos na potencialização e/ ou controle da resposta imune durante a infecção por *T. cruzi* (CARDILLO et al, 2015).

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

Os resultados apresentaram uma diminuição significativa no crescimento e sobrevivência celular ao longo do processo de infecção (72 h) (**Figuras 27 B- D**) quando comparadas com as células controle (não-infectadas) (**Figura 27 A**).

Quando observamos a morfologia das células infectadas, percebemos a formação de grumos celulares em 24h (**Figura 28 C**) e uma diminuição na quantidade de células viáveis em cultura em 72h (**Figura 28 D**) de infecção que estaria associada com alterações morfológicas causadas pelo aumento da parasitemia (**Figura 28**). Isso ocorre porque os macrófagos infectados por *T. cruzi*

produzem IL-12, responsável pela síntese inicial de IFN- γ pelas células NK. O IFN- γ tem um papel importante na ativação de macrófagos. Eles produzem altos níveis de óxido nítrico (NO) que controlam a replicação do parasito na fase aguda da infecção (CARDILLO et al., 1996; SARDINHA et al., 2006). Entretanto, de acordo com SAEFTEL et al (2001), ao final da fase aguda, este efeito desaparece.

ARANTES et al (2004), mostraram que quantidades excessivas de NO têm efeitos prejudiciais devido à sua atividade pró-inflamatória durante a fase aguda. Estudos em modelo murino demonstraram que quantidades exarcebadas de NO produzida ao longo da infecção pelo *T. cruzi*, provocam dano no DNA das células do coração e baço, causando a destruição das mesmas, danificando tecidos e órgãos durante a fase aguda (RIBEIRO et al, 2007). O que poderia explicar o aumento na parasitemia e a diminuição no crescimento e sobrevivência celular com o decorrer do tempo de infecção durante a interação no período de 72 h (**Figura 28 D**), quando foi observado o maior dano quando comparado ao controle e aos tempos de 24h e 48h (**Figuras 28 B-C**). Entretanto, o mecanismo de ação pelo qual o NO realiza seu efeito citotóxico contra o *T. cruzi* não está completamente esclarecido.

Por outro lado, o influxo de Ca^{2+} intracelular induzido por fatores solúveis secretados pelas formas tripomastigotas, cria um cenário favorável para a entrada do parasito na célula hospedeira: um aumento no cálcio citoplasmático libera mais cálcio estocado no retículo endoplasmático via IP3 e induz a despolimerização de filamentos de actina, facilitando a migração de lisossomos necessária para a invasão da célula pelo parasito (VIEIRA et al., 2002; ADESSE et al., 2010). O Ca^{2+} promove a ativação de diversas enzimas que, ativadas, promovem a inativação do ATP (ATPases), lise das membranas celulares (fosfolipases), lise das proteínas estruturais e das membranas (proteases) e fragmentação da cromatina (endonucleases).

Diante destes achados e a fim de avaliar possíveis alterações relacionadas com a comunicação celular no modelo de infecção de células macrófágicas com o *T. cruzi*, foram realizadas análises dos níveis de expressão proteica da Cx43.

Os níveis de expressão de Cx43 se mantiveram presentes nas células controle (**Figura 29**), o que fortalece os achados de nossos resultados de injeção de corantes e imunofluorescência (respectivamente, **Figuras 25 e 31**).

No entanto, os níveis de expressão de Cx43 após 48 h de infecção foram significativamente maiores do que os expressos pelas células não infectadas. E, em 72 h, esses níveis decrescem e praticamente desaparecem em 72 h pós-infecção (**Figura 29**) sendo evidenciado pela densitometria representada pela análise estatística do gráfico da **Figura 30**.

Os 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 et al, 2005). Esse 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 et al, 2011). Esta comunicação pode, também, ocorrer por junções comunicantes, de acordo com os achados de FORTES et al., 2004.

Desta forma, poderíamos inferir através dos dados achados nos experimentos imunoeletroréticos (*Western blot*) que haveria uma sinalização para que o macrófago tentasse 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, é possível que, em 48 horas de infecção, não ocorra mais o 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.

No entanto, apesar do processo inflamatório que ocorre na tentativa de combater o parasito, podemos observar que existe uma alteração do arcabouço celular em casos de infecção parasitária.

A fim de avaliar se a infecção pelo *T. cruzi* seria capaz de alterar a organização espacial da proteína Cx43 nas células J774-G8, realizamos experimentos de imunofluorescência (**Figuras 31 - 32**), utilizando a marcação simultânea com os anticorpos anti-Cx43 e Faloidina (anti F-Actina). Os resultados encontrados (**Figura 31 B**) 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 25**), bem como com a literatura (FORTES et al.,2004).

Paralelamente, foi feita a imunomarcação das células com anticorpo F-actina conjugado a faloidina demonstrando que os filamentos de actina estão distribuídos de forma homogênea pelas células J774-G8, sendo observados, principalmente, próximo à membrana plasmática (**Figura 31 C**). Estes dados estão em completa consonância com ALLISON et al (1971), indicando que os filamentos de actina e microtúbulos estão espalhados pelo citoplasma e com forte concentração próxima à superfície celular (membrana plasmática) e estariam envolvidos na mobilidade dos pseudópodes, bem como no tráfico vesicular e de organelas.

Estudos recentes mostraram que os filamentos de actina são importantes durante a invasão de tripomastigotas nas células hospedeiras. A despolimerização da actina estimularia a invasão do parasita (CALER et al., 2000; VIEIRA et al., 2002; NAGAJYOTHI et al., 2008).

Complementando os nossos achados, conseguimos demonstrar, pela primeira vez, a co-localização das proteínas Cx43 e F-actina em células migratórias do sistema imunológico, indicando que a Cx43 estaria interagindo com o citoesqueleto em um possível processo de ancoramento, sendo este decisivo para a formação de canais juncionais funcionais (**Figura 31 D**). Os hemicanais juncionais (conexons) são transportados do complexo de Golgi até a membrana plasmática, através de microtúbulos, e precisam desta estrutura para que possam ser inseridos na membrana plasmática (MUSIL and GOODENOUGH, 1993; DHEIN, 1998, GAIETTA et al., 2002; SEGRETAIN and 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 and MOOLENAR (1998) demonstraram que as junções comunicantes formadas pela Cx43 também interagem com outras proteínas. Através de experimentos de imunoprecipitação e imunofluorescência, demonstraram que a região carboxiterminal da conexina43 pode interagir com o 2º domínio PDZ da proteína ZO1 (Zona Ocludens 1), uma proteína associada às junções do tipo *Tight Junction* e que, segundo estes estudos estariam envolvidas com o ancoramento das conexinas na membrana plasmática. Além disso, MATSUSHITA et al. (1999) demonstraram que a Cx43 também poderia estar relacionada com outras proteínas celulares, como por exemplo, integrina, desmoplaquinas (proteínas

as α -cateninas estariam co-localizadas com a Cx43 no início da formação da placa juncional na membrana plasmática, sendo essenciais no endereçamento e inserção da conexina na membrana, como foi observado em ensaios de microscopia confocal.

Os mesmos experimentos de imunofluorescência também foram realizados em culturas de células infectadas com o parasita *T. cruzi* no período de 72 h (**FIGURA 32**) e os resultados obtidos indicaram que a marcação para a proteína Cx43 não ocorria na membrana, mas encontrava-se no citoplasma (**Figura 32 B**) e que houve uma evidente diminuição da marcação com a Faloidina (**Figura 32 C**).

Na **Figura 32 D** observamos que as células marcadas para Cx43 no citoplasma não apresentaram marcação para faloidina indicando que a desorganização no citoesqueleto poderia estar impedindo as células de se comunicarem uma vez que a proteína Cx43 fica confinada no citosol e não consegue ser inserida na membrana da célula. Considerando que as moléculas de actina (que no macrófago corresponde à F-actina) e que, segundo GIEPMANS (2004), é importante para inserção da conexina na membrana, haja visto que as vesículas contendo a proteína conexina ao saírem do complexo de Golgi utilizam os microtúbulos como via de endereçamento proteico para membrana plasmática (SEGRETAIN and FALK, 2004).

Deste modo, além de notar uma 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.

A partir destes achados, podemos inferir que a comunicação juncional em macrófagos pode ter um papel importante no microambiente inflamatório, uma vez que é capaz 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 nos remeter a um papel de destaque no ambiente infecto-inflamatório.

Para tanto, é necessário que se façam experimentos de microscopia com imunofluorescência e injeções de corante para que possamos de fato afirmar que as células J774-G8 não fazem comunicação juncional após infecção com o *T. cruzi*.

7. CONCLUSÕES

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

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

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

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

7.4. A expressão proteica de Cx43, analisada por *western blot*, mostrou-se aumentada em células de linhagem macrofágicas J774-G8 infectadas em 48 horas com o *T. cruzi*, quando comparadas com as células não infectadas;

7.5. As proteínas Cx43 e F-actina estão co-localizadas na membrana plasmática de linhagem macrofágica J774-G8;

7.6. As células J774-G8 infectadas com o *T. cruzi* sofrem uma sensível redução nas proteínas Cx43 e F-actina localizadas na membrana, após 72 horas de infecção.

8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ABASCAL, Federico; ZARDOYA, Rafael. Evolutionary analyses of gap junction protein families. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 1, p. 4-14, 2013.

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology**. 7ªEd. Elsevier, 2011.

ACOSTA-SERRANO, Alvaro et al. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 114, n. 2, p. 143-150, 2001.

ADAMS, Dolph O.; HAMILTON, Thomas A. The cell biology of macrophage activation. **Annual review of immunology**, v. 2, n. 1, p. 283-318, 1984.

ADEREM, Alan; UNDERHILL, David M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual review of immunology**, v. 17, n. 1, p. 593-623, 1999.

ADESSE, Daniel et al. *Trypanosoma cruzi* induces changes in cardiac connexin43 expression. **Microbes and infection**, v. 10, n. 1, p. 21-28, 2008.

ADESSE, Daniel et al. Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 5, p. 846-854, 2010.

AHMAD, Shoeb; MARTIN, Patricia EM; EVANS, W. Howard. Assembly of gap junction channels. **The FEBS Journal**, v. 268, n. 16, p. 4544-4552, 2001.

AKIRA, Shizuo; TAKEDA, Kiyoshi. Toll-like receptor signalling. **Nature reviews immunology**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

AKIYAMA, Motofusa et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel Cx43 partner protein CIP150. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 335, n. 4, p. 1264-1271, 2005.

ALBAREDA, María Cecilia et al. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. **International immunology**, v. 18, n. 3, p. 465-471, 2006.

ALBERTS, Bruce et al. Molecular biology of the cell. 3rd. **New York: Garland Pub**, v. 43, n. 1294, p. 67, 1994.

ALLISON, A. C.; DAVIES, Poo; DE PETRIS, S. Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. **Nature**, v. 232, n. 31, p. 153-155, 1971.

ALVES, Luiz A. et al. Are there functional gap junctions or junctional hemichannels in macrophages?. **Blood**, v. 88, n. 1, p. 328-334, 1996.

ALVES, L. A. et al. Gap junction modulation by extracellular signaling molecules: the thymus model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 4, p. 457-465, 2000.

ANDRADE, Daniela V.; GOLLOB, Kenneth J.; DUTRA, Walderez O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.

ANDREWS, NORMA W.; COLLI, WALTER. Adhesion and interiorization of Trypanosoma cruzi in mammalian cells. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 264-269, 1982.

ARANTES, Rosa ME et al. Interferon- γ -induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in Trypanosoma cruzi-infected mice. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 4, p. 1361-1368, 2004.

BAI, Donglin. Atrial fibrillation-linked GJA5/connexin40 mutants impaired gap junctions via different mechanisms. **FEBS letters**, v. 588, n. 8, p. 1238-1243, 2014.

BARR, Stephen C. et al. A factor from *Trypanosoma cruzi* induces repetitive cytosolic free Ca²⁺ transients in isolated primary canine cardiac myocytes. **Infection and immunity**, v. 64, n. 5, p. 1770-1777, 1996.

BARBOSA, Paulo Roberto Benchimol. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International journal of cardiology**, v. 112, n. 1, p. 132-133, 2006.

BENNETT, Michael VL et al. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. **Trends in neurosciences**, v. 26, n. 11, p. 610-617, 2003.

BERGDOLT, B. A. et al. *Trypanosoma cruzi*: effects of infection on receptor-mediated chronotropy and Ca²⁺ mobilization in rat cardiac myocytes. **Experimental parasitology**, v. 78, n. 2, p. 149-160, 1994.

BERGOFFEN, J. et al. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information**, v. 262, n. 5142, p. 2039-2041, 1993.

BERN, Caryn. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527-2534, 2011.

BERN, Caryn. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.

BERTHOUD, Viviana M. et al. Pathways for degradation of connexins and gap junctions. **Cardiovascular research**, v. 62, n. 2, p. 256-267, 2004.

BEYER, E. C.; STEINBERG, T. H. Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 13, p. 7971-7974, 1991.

BEYER, ERIC C.; STEINBERG, THOMAS H. Connexins, gap-junction proteins, and ATP-induced pores in macrophages. **Progr Cell Res** 3, p. 71-74, 1993.

BEYER, Eric C.; BERTHOUD, Viviana M. Connexin hemichannels in the lens. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon- γ . **Annual review of immunology**, v. 15, n. 1, p. 749-795, 1997.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BREIDERT, Stephanie et al. Trafficking pathways of Cx49-GFP in living mammalian cells. **Biological chemistry**, v. 386, n. 2, p. 155-160, 2005.

BRENER, Z. Relações parasita-hospedeiro na doença de Chagas: mecanismos de infecção e doença. In: **Annales de la Société belge de médecine tropicale**. Instituut voor tropische geneeskunde, 1985. p. 9-13.

BUTKEVICH, Eugenia et al. Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. **Current biology**, v. 14, n. 8, p. 650-658, 2004.

CALER, Elisabet V. et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **The EMBO journal**, v. 17, n. 17, p. 4975-4986, 1998.

CALER, Elisabet V. et al. Dual Role of Signaling Pathways Leading to Ca²⁺ and Cyclic AMP Elevation in Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 6602-6610, 2000.

CARDILLO, Fabiola et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and immunity**, v. 64, n. 1, p. 128-134, 1996.

CARDILLO, Fabíola et al. NK1. 1+ Cells and T-Cell Activation in Euthymic and Thymectomized C57Bl/6 Mice during Acute *Trypanosoma Cruzi* Infection. **Scandinavian journal of immunology**, v. 55, n. 1, p. 96-104, 2002.

CARDILLO, Fabíola et al. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 73, n. 9, p. ftv082, 2015.

CARVALHO, ANTONIO C. CAMPOS et al. Conduction Defects and Arrhythmias in Chagas' Disease. **Journal of cardiovascular electrophysiology**, v. 5, n. 8, p. 686-698, 1994.

CASCIO, Wayne E. et al. Ischemia-induced arrhythmia: the role of connexins, gap junctions, and attendant changes in impulse propagation. **Journal of electrocardiology**, v. 38, n. 4, p. 55-59, 2005.

CERWENKA, Adelheid; LANIER, Lewis L. Natural killer cells, viruses and cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 1, p. 41-49, 2001.

CHANSON, Marc et al. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1711, n. 2, p. 197-207, 2005.

CHATELAIN, Eric. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel?. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 15, p. 98-103, 2017.

CHEN, Grace Y.; NUÑEZ, Gabriel. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826-837, 2010.

CHEVER, Oana; LEE, Chun-Yao; ROUACH, Nathalie. Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 34, p. 11228-11232, 2014.

COLLI, Walter; ALVES, Maria Júlia Manso. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 37-49, 1999.

CONTRERAS, Jorge E. et al. Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11388-11393, 2003.

COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

CRUCIANI, V.; MIKALSEN, S.-O. The vertebrate connexin family. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 10, p. 1125-1140, 2006.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

CRUZ-MACHADO, S. S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. **Revista de Biologia da USP**, v. 4, p. 40-43, 2010.

CUZZOCREA, Salvatore. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 1, p. 72-82, 2005.

DE CARVALHO, Tecia M. Ulisses; DE SOUZA, Wanderley. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell structure and function**, v. 14, n. 4, p. 383-392, 1989.

DE CARVALHO, A. Campos et al. Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with *Trypanosoma cruzi*. **Circulation Research**, v. 70, n. 4, p. 733-742, 1992.

DE CARVALHO, Antonio C. Campos et al. Gap junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as a consequence of protozoan infection. **Brain research**, v. 790, n. 1, p. 304-314, 1998.

DE MAIO, Antonio; VEGA, Virginia L.; CONTRERAS, Jorge E. Gap junctions, homeostasis, and injury. **Journal of cellular physiology**, v. 191, n. 3, p. 269-282, 2002.

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan**, p. 88-126, 2000.

DE SOUZA, Wanderley; DE CARVALHO, Tecia Maria Ulisses; BARRIAS, Emile Santos. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International journal of cell biology**, v. 2010, 2010.

DE SOUZA, Wanderley. **Protozoologia Médica**. Editora Rubio, 2013.

DEAN, Michael F.; COOPER, John A.; STAHL, Philip. Cell contact and direct transfer between co-cultured macrophages and fibroblasts. **Journal of leukocyte biology**, v. 43, n. 6, p. 539-546, 1988.

DECROCK, Elke et al. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die?. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 4, p. 524-536, 2009.

DELMAR, Mario et al. A molecular model for the chemical regulation of connexin43 channels: the “ball-and-chain” hypothesis. **Current Topics in Membranes**, v. 49, p. 223-248, 1999.

DELVES, Peter J.; ROITT, Ivan M. The immune system. **New England journal of medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DESPLANTEZ, Thomas. Cardiac Cx43, Cx40 and Cx45 co-assembling: involvement of connexins epitopes in formation of hemichannels and Gap junction channels. **BMC cell biology**, v. 18, n. 1, p. 3, 2017.

DHEIN, Stefan. Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 19, n. 6, p. 229-241, 1998.

DHEIN, Stefan. Cardiac ischemia and uncoupling: gap junctions in ischemia and infarction. In: **Cardiovascular gap junctions**. Karger Publishers, 2006. p. 198-212.

DHEIN, Stefan et al. Remodeling of cardiac passive electrical properties and susceptibility to ventricular and atrial arrhythmias. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

DIAS, João Carlos Pinto et al. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 3, p. 375-379, 2011.

DOBROWOLSKI, Radoslaw et al. The conditional connexin43G138R mouse mutant represents a new model of hereditary oculodentodigital dysplasia in humans. **Human molecular genetics**, v. 17, n. 4, p. 539-554, 2007.

DUFFY, Heather S.; DELMAR, Mario; SPRAY, David C. Formation of the gap junction nexus: binding partners for connexins. **Journal of Physiology-Paris**, v. 96, n. 3-4, p. 243-249, 2002.

DUFFY, Heather S.; FORT, Alfredo G.; SPRAY, David C. Cardiac connexins: genes to nexus. In: **Cardiovascular Gap Junctions**. Karger Publishers, 2006. p. 1-17.

DUMONTEIL, Eric; HERRERA, Claudia. Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005422, 2017.

DURAN-REHBEIN, Gabriel Alberto et al. Mammalian cellular culture models of Trypanosoma cruzi infection: a review of the published literature. **Parasite**, v. 21, 2014.

DUTRA, Walderez O.; GOLLOB, Kenneth J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 3, p. 287, 2008.

DUTRA, Walderez O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite immunology**, v. 36, n. 8, p. 377-387, 2014.

EUGENÍN, Eliseo A. et al. Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon- γ and tumor necrosis factor- α . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 7, p. 4190-4195, 2001.

EUGENÍN, Eliseo A. et al. TNF- α plus IFN- γ induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1320-1328, 2003.

EVANS, W. Howard; DE VUYST, Elke; LEYBAERT, Luc. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 1, p. 1-14, 2006.

FALK, Matthias M. et al. Molecular mechanisms regulating formation, trafficking and processing of annular gap junctions. **BMC cell biology**, v. 17, n. 1, p. S22, 2016.

FORTES, Fabio SA et al. Modulation of intercellular communication in macrophages: possible interactions between GAP junctions and P2 receptors. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 20, p. 4717-4726, 2004.

FREITAS, Humberto FG et al. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. **International journal of cardiology**, v. 102, n. 2, p. 239-247, 2005.

FUJIMOTO, J. et al. Molecular cloning and characterization of focal adhesion kinase of *Drosophila melanogaster*. In: **MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL**. 8120 WOODMONT AVE, STE 750, BETHESDA, MD 20814-2755 USA: AMER SOC CELL BIOLOGY, 1997. p. 2324-2324.

FUSHIKI, Daisuke et al. Phylogenetic and bioinformatic analysis of gap junction-related proteins, innexins, pannexins and connexins. **Biomedical research**, v. 31, n. 2, p. 133-142, 2010.

GAIETTA, Guido et al. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 503-507, 2002.

GAJARDO-GÓMEZ, Rosario; LABRA, Valeria C.; ORELLANA, Juan A. Connexins and pannexins: new insights into microglial functions and dysfunctions. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 9, 2016.

GARCIA, Leila Posenato; DUARTE, Elisete. A contribuição do Consenso brasileiro em doença de Chagas no contexto epidemiológico nacional. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. SPE, p. 5-6, 2016.

GARCÍA-DORADO, David; RODRÍGUEZ-SINOVAS, Antonio; RUIZ-MEANA, Marisol. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia–reperfusion. **Cardiovascular research**, v. 61, n. 3, p. 386-401, 2004.

GARZONI, Luciana R. et al. Characterization of $[Ca^{2+}]_i$ responses in primary cultures of mouse cardiomyocytes induced by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 487-493, 2003.

GIEPMANS, Ben NG; MOOLENAAR, Wouter H. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. **Current Biology**, v. 8, n. 16, p. 931-934, 1998.

GIEPMANS, Ben NG. Gap junctions and connexin-interacting proteins. **Cardiovascular research**, v. 62, n. 2, p. 233-245, 2004.

GONTIJO, Eliane Dias et al. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 3, p. 243-254, 2009.

GOODENOUGH, Daniel A.; PAUL, David L. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 4, n. 4, p. 285-295, 2003.

GOODENOUGH, Daniel A.; PAUL, David L. Gap junctions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 1, p. a002576, 2009.

GREEN, Colin R.; SEVERS, Nicholas J. Distribution and role of gap junctions in normal myocardium and human ischaemic heart disease. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 99, n. 2, p. 105-120, 1993.

GUIMARÃES, Marco Cesar Cunegundes; DA GAMA FILHO, Reubes Valério. DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS-MACRÓFAGOS DE GALLUS GALLUS: UMA ABORDAGEM MORFOLÓGICA. **PerspectivasOnLine 2007-2010**, v. 3, n. 9, 2014.

HANDEL, Andreas et al. Gap junction-mediated antigen transport in immune responses. **Trends in immunology**, v. 28, n. 11, p. 463-466, 2007.

HARRIS, Andrew L. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 34, n. 3, p. 325-472, 2001.

HERVÉ, Jean-Claude; BOURMEYSTER, Nicolas; SARROUILHE, Denis. Diversity in protein–protein interactions of connexins: emerging roles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1662, n. 1, p. 22-41, 2004.

HOWARD, Elizabeth J. et al. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 121, n. 1, p. 22-33, 2014.

<http://centrotecnico.shinsei.com.br/fisiopatologia-dos-granulomas> Acesso: 11/03/2017 as 10:23h

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 26ª edição, AMGH. 2014.

JOHANSEN, David et al. Ischemia induces closure of gap junctional channels and opening of hemichannels in heart-derived cells and tissue. **Cellular physiology and biochemistry**, v. 28, n. 1, p. 103-114, 2011.

JOHN, Scott A. et al. Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 1, p. 236-240, 1999.

JOHNSTONE, Scott R. et al. Posttranslational modifications in connexins and pannexins. **The Journal of membrane biology**, v. 245, n. 5-6, p. 319-332, 2012.

JUNQUEIRA LUIZ, C.; CARNEIRO, J. Histología básica. Texto y atlas. 2013.

KAMERMANS, Maarten et al. Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1178-1180, 2001.

KANE, A. B.; BOLS, N. C. A study of metabolic cooperation with rat peritoneal macrophages. **Journal of cellular physiology**, v. 102, n. 3, p. 385-393, 1980.

KÖBERLE, Fritz. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Advances in parasitology**, v. 6, p. 63-116, 1968.

KOZORIZ, Michael G. et al. Cerebral ischemic injury is enhanced in a model of oculodentodigital dysplasia. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 549-556, 2013.

KUMAR, Nalin M.; GILULA, Norton B. The gap junction communication channel. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 381-388, 1996.

LACERDA, Aline Lopes de. Photography and documental value: the Carlos Chagas archive. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 16, p. 115-138, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAIRD, Dale W. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1711, n. 2, p. 172-182, 2005.

LAIRD, Dale W. Life cycle of connexins in health and disease. **Biochemical Journal**, v. 394, n. 3, p. 527-543, 2006.

LEVY, J. A. et al. Possible communication between murine macrophages oriented in linear chains in tissue culture. **Experimental cell research**, v. 103, n. 2, p. 375-385, 1976.

LI, Chen et al. Regulatory effect of connexin 43 on basal Ca²⁺ signaling in rat ventricular myocytes. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e36165, 2012.

LI, Fenghua et al. Activation of connexin-43 hemichannels can elevate [Ca²⁺]_i and [Na⁺]_i in rabbit ventricular myocytes during metabolic inhibition. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 33, n. 12, p. 2145-2155, 2001.

LIMA, João José Pedroso (Ed.). **Física em medicina nuclear: temas e aplicações**. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press, 2008.

LU, David et al. ATP released from cardiac fibroblasts via connexin hemichannels activates profibrotic P2Y₂ receptors. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 6, p. 2580-2591, 2012.

MACHADO, Fabiana S. et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2012. p. 753-770.

MACMICKING, John; XIE, Qiao-wen; NATHAN, Carl. Nitric oxide and macrophage function. **Annual review of immunology**, v. 15, n. 1, p. 323-350, 1997.

MAKOWSKI, Lee et al. Gap junction structures: Analysis of the x-ray diffraction data. **The Journal of Cell Biology**, v. 74, n. 2, p. 629-645, 1977.

MANDAL, Amritlal; SHAHIDULLAH, Mohammad; DELAMERE, Nicholas A. Calcium entry via connexin hemichannels in lens epithelium. **Experimental eye research**, v. 132, p. 52-58, 2015.

MARTIN, Carla A. et al. Gap junctional communication between murine macrophages and intestinal epithelial cell lines. **Cell adhesion and communication**, v. 5, n. 6, p. 437-449, 1998.

MARTÍNEZ, Agustín D. et al. Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 2, p. 309-322, 2009.

MATSUSHITA, Tsutomu et al. Remodeling of cell-cell and cell–extracellular matrix interactions at the border zone of rat myocardial infarcts. **Circulation research**, v. 85, n. 11, p. 1046-1055, 1999.

MEDZHITOV, Ruslan; JANEWAY JR, Charles. Innate immunity. **N Engl J Med**, v. 2000, n. 343, p. 338-344, 2000.

MEDZHITOV, Ruslan; PRESTON-HURLBURT, Paula; JANEWAY, Charles A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997.

MEIGH, Louise et al. Connexin26 hemichannels with a mutation that causes KID syndrome in humans lack sensitivity to CO₂. **Elife**, v. 3, p. e04249, 2014.

MELO, Tatiana G. et al. Trypanosoma cruzi infection disrupts vinculin costameres in cardiomyocytes. **European journal of cell biology**, v. 83, n. 10, p. 531-540, 2004.

MELO, T. G. et al. Disarray of sarcomeric alpha-actinin in cardiomyocytes infected by Trypanosoma cruzi. **Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 171-178, 2006.

MENEZES, Ana Paula de Jesus. Correlação entre a carga parasitária do *Trypanosoma cruzi* no tecido cardíaco e detecção de autoanticorpos no soro de cães infectados com a patologia da doença de chagas experimental. 2015.

MEŞE, Gülistan; RICHARD, Gabriele; WHITE, Thomas W. Gap junctions: basic structure and function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 11, p. 2516-2524, 2007.

MONCAYO, Alvaro. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

MONTECINO-RODRIGUEZ, Encarnacion; LEATHERS, Hyosuk; DORSHKIND, Kenneth. Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. **Blood**, v. 96, n. 3, p. 917-924, 2000.

MORENO, Alonso P. Biophysical properties of homomeric and heteromultimeric channels formed by cardiac connexins. **Cardiovascular research**, v. 62, n. 2, p. 276-286, 2004.

MOSSMAN, Brooke T.; CHURG, Andrew. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 157, n. 5, p. 1666-1680, 1998.

MUSIL, Linda S.; GOODENOUGH, Daniel A. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. **Cell**, v. 74, n. 6, p. 1065-1077, 1993.

NAGAJYOTHI, Fnu et al. *Trypanosoma cruzi* infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype. **Obesity**, v. 16, n. 9, p. 1992-1997, 2008.

NIELSEN, Morten Schak et al. Gap junctions. **Comprehensive Physiology**, 2012.

NIHEI, Oscar K. et al. A novel form of cellular communication among thymic epithelial cells: intercellular calcium wave propagation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 285, n. 5, p. C1304-C1313, 2003.

NORMAN, Francesca F.; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Chagas disease and breast-feeding. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 10, p. 1561, 2013.

ORELLANA, Juan A. et al. Glial hemichannels and their involvement in aging and neurodegenerative diseases. **Reviews in the neurosciences**, v. 23, n. 2, p. 163-177, 2012.

OSUNA, A. et al. Trypanosoma cruzi: calcium ion movement during internalization in host HeLa cells. **International journal for parasitology**, v. 20, n. 5, p. 673-676, 1990.

OVIEDO-ORTA, Ernesto; EVANS, W. Howard. Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1662, n. 1, p. 102-112, 2004.

PARKIN, Jacqueline; COHEN, Bryony. An overview of the immune system. **The Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-1789, 2001.

PATEL, Dakshesh et al. Atrial fibrillation-associated Connexin40 mutants make hemichannels and synergistically form gap junction channels with novel properties. **FEBS letters**, v. 588, n. 8, p. 1458-1464, 2014.

PERACCHIA, Camillo. Chemical gating of gap junction channels: roles of calcium, pH and calmodulin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1662, n. 1, p. 61-80, 2004.

PIEHL, Michelle et al. Internalization of large double-membrane intercellular vesicles by a clathrin-dependent endocytic process. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 2, p. 337-347, 2007.

PINAZO, María Jesús et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Gastroenterología y hepatología**, v. 33, n. 3, p. 191-200, 2010.

PLOTKIN, Lilian I. Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

POLACEK, Denise et al. Gap junctional communication between vascular cells. Induction of connexin43 messenger RNA in macrophage foam cells of atherosclerotic lesions. **The American journal of pathology**, v. 142, n. 2, p. 593, 1993.

POLONTCHOUK, Lioudmila et al. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 38, n. 3, p. 883-891, 2001.

PORVAZNIK, Martin; MACVITTIE, Thomas J. Detection of gap junctions between the progeny of a canine macrophage colony-forming cell in vitro. **The Journal of cell biology**, v. 82, n. 2, p. 555-564, 1979.

RAMIREZ, MARCEL IVAN et al. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and immunity**, v. 61, n. 9, p. 3636-3641, 1993.

RASSI, Anis et al. Chagas' heart disease. **Clinical cardiology**, v. 23, n. 12, p. 883-889, 2000.

RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RASSI, Anis; DE REZENDE, Joffre Marcondes. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

RETAMAL, Mauricio A.; REYES, Edison P.; ALCAYAGA, Julio. Petrosal ganglion: a more complex role than originally imagined. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

RETAMAL, Mauricio A. et al. Diseases associated with leaky hemichannels. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, 2015.

RIBEIRO, Daniel A. et al. DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 116, n. 3, p. 296-301, 2007.

RODRIGUEZ, Ana et al. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **The Journal of cell biology**, v. 129, n. 5, p. 1263-1273, 1995.

RODRIGUEZ, Ana et al. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. **The Journal of cell biology**, v. 134, n. 2, p. 349-362, 1996.

ROSS, Russell. Atherosclerosis—an inflammatory disease. **New England journal of medicine**, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.

SAEFTEL, Michael; FLEISCHER, Bernhard; HOERAUF, Achim. Stage-Dependent Role of Nitric Oxide in Control of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infection and immunity**, v. 69, n. 4, p. 2252-2259, 2001.

SAEZ, J. C. et al. Gap junctions in cells of the immune system: structure, regulation and possible functional roles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 4, p. 447-455, 2000.

SÁEZ, Juan C. et al. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. **Physiological reviews**, v. 83, n. 4, p. 1359-1400, 2003.

SÁEZ, Juan C. et al. Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. **Experimental cell research**, v. 316, n. 15, p. 2377-2389, 2010.

SALAMEH, Aida; DHEIN, Stefan. Adrenergic control of cardiac gap junction function and expression. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 383, n. 4, p. 331-346, 2011.

SANCHEZ, Helmuth A. et al. Altered inhibition of Cx26 hemichannels by pH and Zn²⁺ in the A40V mutation associated with keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 31, p. 21519-21532, 2014.

SARDINHA, Luiz Roberto et al. Contribution of NK, NK T, $\gamma\delta$ T, and $\alpha\beta$ T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 74, n. 4, p. 2031-2042, 2006.

SCHAIBLE, Ulrich E.; COLLINS, Helen L.; KAUFMANN, Stefan HE. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. **Advances in immunology**, v. 71, p. 267-377, 1998.

SEABRA, Sergio H.; DE SOUZA, Wanderley; DAMATTA, Renato A. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. **Experimental parasitology**, v. 100, n. 1, p. 62-70, 2002.

SEGRETAIN, Dominique; FALK, Matthias M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1662, n. 1, p. 3-21, 2004.

SEVERS, Nicholas J. et al. Gap junction alterations in human cardiac disease. **Cardiovascular research**, v. 62, n. 2, p. 368-377, 2004.

SIPOS, Arnold et al. Connexin 30 deficiency impairs renal tubular ATP release and pressure natriuresis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 8, p. 1724-1732, 2009.

SÖHL, Goran; WILLECKE, Klaus. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. **Cell communication & adhesion**, v. 10, n. 4-6, p. 173-180, 2003.

SOSINSKY, Gina. Gap junction structure: new structures and new insights. **Current topics in membranes**, v. 49, p. 1-22, 1999.

SOUZA, Wanderley. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

SPRAY, D. C. et al. Gating of gap junction channels. **Biophysical Journal**, v. 45, n. 1, p. 219-230, 1984.

SPRAY, David C.; DUFFY, Heather S.; SCEMES, Eliana. Gap junctions in glia. In: **The Functional Roles of Glial Cells in Health and Disease**. Springer US, 1999. p. 339-359.

SPRAY, David C.; YE, Zu-Cheng; RANSOM, Bruce R. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. **Glia**, v. 54, n. 7, p. 758-773, 2006.

STEHBERG, Jimmy et al. Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 9, p. 3649-3657, 2012.

STEVERDING, Dietmar. The history of Chagas disease. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 317, 2014.

SUN, Li-Qian et al. Astrocytic p-connexin 43 regulates neuronal autophagy in the hippocampus following traumatic brain injury in rats. **Molecular medicine reports**, v. 9, n. 1, p. 77-82, 2014

SUN, Yiguo et al. Atrial fibrillation-linked germline GJA5/connexin40 mutants showed an increased hemichannel function. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95125, 2014.

TAKADA, Hiroya; FURUYA, Kishio; SOKABE, Masahiro. Mechanosensitive ATP release from hemichannels and Ca²⁺ influx through TRPC6 accelerate wound closure in keratinocytes. **J Cell Sci**, v. 127, n. 19, p. 4159-4171, 2014.

TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TALBOT, Julie; VERRECCHIA, Franck. Communication intercellulaire et remodelage osseux. **Biologie Aujourd'hui**, v. 206, n. 2, p. 125-134, 2012.

TANIWAKI, Noemi N. et al. Trypanosoma cruzi disrupts myofibrillar organization and intracellular calcium levels in mouse neonatal cardiomyocytes. **Cell and tissue research**, v. 324, n. 3, p. 489-496, 2006.

TARLETON, Rick L. Chagas disease: a role for autoimmunity?. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 10, p. 447-451, 2003.

TEIXEIRA, Dirceu E. et al. Atlas Didático–Ciclo de Vida do Tripanosoma cruzi. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ. **Consórcio CEDERJ**. 51p, 2011.

THÉVENIN, Anastasia F. et al. Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. **Physiology**, v. 28, n. 2, p. 93-116, 2013.

TROWBRIDGE, Henry O.; EMLING, Robert C. **Inflamação: uma revisão do processo**. Quintessence, 1996.

UNKELESS, Jay C. et al. Fc-receptor variants of a mouse macrophage cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 3, p. 1400-1404, 1979.

UNWIN, P. N. T.; ENNIS, P. D. Two configurations of a channel-forming membrane protein. **Nature**, v. 307, n. 5952, p. 609-613, 1984.

VEENSTRA, Richard D. Ion permeation through connexin gap junction channels: effects on conductance and selectivity. **Current Topics in Membranes**, v. 49, p. 95-129, 1999.

VIEIRA, Mauricio et al. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Histochemistry and cell biology**, v. 118, n. 6, p. 491-500, 2002.

VILLANELO, F. et al. Accessing gap-junction channel structure-function relationships through molecular modeling and simulations. **BMC cell biology**, v. 18, n. 1, p. 5, 2017.

VON ANDRIAN, Ulrich H.; MACKAY, Charles R. T-cell function and migration—two sides of the same coin. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 14, p. 1020-1034, 2000.

WEINER, Howard L.; FRENKEL, Dan. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 5, p. 404-416, 2006.

WERNER, Rudolf et al. Formation of hybrid cell-cell channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 14, p. 5380-5384, 1989.

WHITE, Thomas W.; BRUZZONE, Roberto. Intercellular communication in the eye: clarifying the need for connexin diversity. **Brain research reviews**, v. 32, n. 1, p. 130-137, 2000.

WILLECKE, Klaus et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. **Biological chemistry**, v. 383, n. 5, p. 725-737, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. Chagas Disease (American trypanosomiasis). Who Fact Sheet, Media Center, n. 340, June-2010 [http](http://).

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates= Maladie de Chagas en Amérique latine: le point épidémiologique basé sur les estimations de 2010. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 90, n. 06, p. 33-44, 2015.

WONG, Cindy W.; CHRISTEN, Thomas; KWAK, Brenda R. Connexins in leukocytes: shuttling messages?. **Cardiovascular research**, v. 62, n. 2, p. 357-367, 2004.

WONG, Cindy W. et al. Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. **Nature medicine**, v. 12, n. 8, p. 950-954, 2006.

XIA, Yingqiu; NAWY, Scott. The gap junction blockers carbenoxolone and 18 β -glycyrrhetic acid antagonize cone-driven light responses in the mouse retina. **Visual neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 429-435, 2003.

YOSHIDA, Nobuko. Trypanosoma cruzi infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology international**, v. 57, n. 2, p. 105-109, 2008.

<biologia-ap.no.comunidades.net/mecanismos-de-defesa-especificos>. Acesso: 10/03/2017 as 19:36h