

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE

**COMUNICAÇÃO JUNCIONAL EM MACRÓFAGOS NO
PROCESSO INFECTO INFLAMATÓRIO *in vitro* COM
*Toxoplasma gondii***

Gabriella Oliveira Alves Moreira de Carvalho

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**COMUNICAÇÃO JUNCIONAL EM MACRÓFAGOS NO
PROCESSO INFECTO INFLAMATÓRIO *in vitro* COM
*Toxoplasma gondii***

GABRIELLA OLIVEIRA ALVES MOREIRA DE CARVALHO

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

Tese de doutorado submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Doutor em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas

Seropédica, RJ
Abril de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

0331c Oliveira Alves Moreira de Carvalho, Gabriella, 1993-
COMUNICAÇÃO JUNCIONAL EM MACRÓFAGOS NO PROCESSO
INFECTO INFLAMATÓRIO *in vitro* COM *Toxoplasma gondii* /
Gabriella Oliveira Alves Moreira de Carvalho. - Rio
de Janeiro, 2023.
188 f.: il.

Orientador: Fabio da Silva de Azevedo Fortes.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências
Fisiológicas, 2023.

1. Junção Comunicante. 2. Macrófagos. 3. *Toxoplasma*
gondii. I. da Silva de Azevedo Fortes, Fabio, 1977-,
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências
Fisiológicas III. Título.



TERMO N° 458/2023 - DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Nº do Protocolo: 23083.026484/2023-44

Seropédica-RJ, 28 de abril de 2023.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

GABRIELA OLIVEIRA ALVES MOREIRA DE CARVALHO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: (Fisiologia e Farmacologia).

TESE APROVADA EM 24/04/2023

BANCA EXAMINADORA:

Dr Fabio da Silva de Azevedo Fortes (Orientador – UEZO)

Profª Drª Regina Coeli dos Santos Goldenberg (Membro Externo – UFRJ)

Prof Dr Sergio Henrique Seabra (Membro Externo – UENF)

Prof Dr Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno - UFRRJ)

Prof Dr Bruno Guimarães Marinho (Membro Interno - UFRRJ)

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 30/04/2023 08:38)

BRUNO GUIMARAES MARINHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: ####740#3

(Assinado digitalmente em 28/04/2023 15:12)

WELLINGTON DA SILVA CORTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: ####69#0

(Assinado digitalmente em 03/05/2023 10:59)

FABIO DA SILVA DE AZEVEDO FORTES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.627-##

(Assinado digitalmente em 05/06/2023 11:25)

SERGIO HENRIQUE SEABRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.107-##

(Assinado digitalmente em 29/04/2023 09:30)

REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.007-##

Dedicatória

Primeiramente dedico este trabalho a **Deus** em agradecimento a sua fidelidade!

Aos meus pais, **Celso Moreira de Carvalho e Ana Beatriz de Oliveira Alves**
Maciel Carvalho.

Ao meu marido **Sidney Cardoso de Lima.**

A minha irmã **Isabella Oliveira Alves Moreira de Carvalho.**

Esta vitória é de todos nós!

Obrigada por todo o amor, dedicação, apoio e compreensão empenhados a mim. Amo muito vocês!

Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus que sempre tem sido fiel a mim! Desde o início tem me orientado em cada passo que dou para conquistar esse sonho que não é apenas meu, mais de toda a minha família! Agradeço pela força, suporte e saúde para galgar os degraus da vida. Todos os objetivos alcançados foram através das suas mãos e cuidado.

Aos meus pais, **Celso Moreira e Ana Beatriz**! Obrigada por sempre terem me dado a possibilidade de seguir os meus sonhos e crescer. Reconheço cada demonstração de amor e cuidado, que muitas vezes foram em forma de sacrifício. Vocês são o meu exemplo de vida, fé e perseverança. Hoje sou fruto dos princípios que me ensinaram e das escolhas que tomaram visando a melhor forma de me proporcionar todas as possibilidades no caminho que escolhi seguir. Obrigada por terem feito possível e o impossível para estar junto a mim e em todos os detalhes, me ajudando. Se hoje eu venci mais esta etapa é porque tenho vocês ao meu lado, demonstrando o melhor modelos de pessoas boas, honestas, humildes, amáveis e alegres. Vocês são as minhas fontes de inspiração para a vida. Amo vocês!

Ao meu amado marido **Sidney Lima**. Seguimos construindo uma vida juntos e seu companheirismo e apoio me impulsiona a lugares altos com o equilíbrio entre o sonho e o palpável. Seu amor, paciência, carinho e atenção foram fundamentais neste momento de conclusão, assim como em todo o processo. Ainda iremos alcançar muitas coisas juntos, apoiando um ao outro.

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

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

Ao meu orientador e amigo **Fabio Fortes**. Dentro desta longa caminhada você tem sido um amigo. Você compartilha grandes sonhos comigo e me ajuda a subir os degraus da vida para alcançar o crescimento profissional e pessoal. Obrigada por sua dedicação, que o fez, por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar. Destaco que sua calma na adversidade e paciência em momentos de tensão são grandes características que sigo aprendendo. Por isso, me sinto honrada em ter sido instruída por uma pessoa que além de amar a carreira científica, também ama a família e a família que cultivamos no laboratório. Principalmente, obrigada por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos de trabalho.

Agradeço a minha grande amiga **Olga Maria de Jesus Souza**. Juntas passamos por diversos momentos de alegria e adversidade. Nossa amizade não foi construída apenas em momentos felizes, mas no apoio e suporte em todas as situações! Sua visão de mundo me inspira e sua doçura me conforta. Continue

sonhando alto e não desista nunca, já vencemos muitos problemas juntas e também vamos colher muitas vitórias. Sempre conte comigo!

Gostaria de agradecer a grande família do laboratório LTFCM. Seguimos juntos, lutando pelo crescimento de todos, lutando pela pesquisa! Neste local de crescimento e aprendizado muitas pessoas deixaram a sua marca. Destaco em especial: O Prº **Michel Alexandre Villani Gantus, Daniel Rodrigues, Thiago Manchester, Elinéia de Oliveira, Tiago Nascimento, Ricardo Ramada, Cibele Pimentel e Claudia Cristina Hastenreiter.**

Agradeço também **Tatiana Guinancio** (UFRJ) e a Drª **Juliana Portes** (UFRJ) que acompanharam essa jornada desde o início e sempre me ajudaram. Obrigada pela disposição em me auxiliar sempre que necessário. Com vocês eu aprendi muito.

Agradeço a minha querida amiga Drª **Raquel do Nascimento de Souza** (UFRRJ) que desde o mestrado me acolheu e ensinou. A jornada na ciência é árdua, mas você é o exemplo de que com o suporte e colaboração conseguimos alcançar a nossa vitória!

O trabalho é um prazer quando fazemos o que amamos, e fica ainda melhor quando trabalhamos com amigos. Cada um de vocês possui um lugar no meu coração.

Agradeço ao Profº **Sérgio Seabra** (UENF), com quem tive o prazer de iniciar a carreira científica e me ajudou sempre no que foi necessário. Seu apoio foi fundamental para este trabalho e para minha escolha pessoal de projeto de pesquisa.

A querida Profª **Regina Goldenberg** (UFRJ), sua carreira me inspira e o seu suporte para realização deste trabalho foi fundamental, fornecendo por muitas vezes reagentes e anticorpos. Ao professor Robson Coutinho que forneceu as citocitas necessárias.

Ao Profº. **Antônio Campos de Carvalho** (UFRJ) por abrir as portas para a realização de experimentos em seu laboratório.

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

Agradeço também as agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPQ que financiaram a pesquisa possibilitaram a aquisição dos materiais e reagente necessários.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**"Escolha um trabalho que você ame
e nunca terá que Trabalhar".**

Confúcio

Resumo

COMUNICAÇÃO JUNCIONAL EM MACRÓFAGOS NO PROCESSO INFECTO INFLAMATÓRIO *in vitro* COM *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) é o agente causador da toxoplasmose. Este protozoário possui a característica de ser intracelular obrigatório e ter alta prevalência em todo o mundo, em que se acredita ter infectado um terço da população mundial, causando grande morbidade e mortalidade. Dada à complexidade desta doença, diversas pesquisas têm se dedicado ao estudo de estruturas que estejam associadas às doenças parasitárias. Dentre estas estruturas, estão as Junções Comunicantes que são responsáveis pela troca de íons e pequenos mensageiros que mantêm a homeostase tecidual. Estes canais transmembranares exercem um importante papel na comunicação intercelular em diferentes tecidos, pois permitem a comunicação em diferentes tipos celulares, incluindo os macrófagos. Com isto, a caracterização morfológica e funcional das junções comunicantes em macrófagos, e em particular formada pela conexina 43 tem sido alvo de estudo de diversos grupos, mas seus mecanismos regulatórios ainda merecem esclarecimentos, principalmente diante de alterações patológicas, como nos processos infecto-inflamatórios causados pelo *T. gondii*. Diante disto, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a modulação das junções comunicantes na linhagem macrofágica J774-G8, após a infecção com o parasito *Toxoplasma gondii* e a posterior ativação com fatores pró-imuno inflamatórios. Como metodologia, foi utilizada: (1) Cultura de células J774-G8; (3) Infecção da cultura pelo do *T. gondii* cepa RH; (4) Tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e conjugados (IFN- γ , TNF- α , IFN- γ + TNF- α); (5) Ensaios imunoelétroforéticos (*Western Blot*); e (4) Ensaios de imunofluorescência e análise por microscopia confocal. Os resultados gerais achados foram: (1) A melhora no perfil morfológico das culturas de células J774-G8 infectadas com *T. gondii* tratadas com os fatores pró-imuno-inflamatórios; (2) O aumento da expressão proteica da Cx43 em células J774-G8 infectadas após o tratamento com os fatores imunes pró-inflamatórios, por 24 e 48 horas; (3) A ativação celular estimulada pelo tratamento com fatores conjugados; (4) Os danos no citoesqueleto celular causados pela infecção foram irreversíveis, mesmo após o tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios em células infectadas; (5) O dano ao citoesqueleto impediu o transporte e o ancoramento da Cx43 na membrana plasmática, porém os fatores proveram um aumento dos níveis citoplasmáticos da Cx43. Com isto foi possível concluir que: a infecção com o *T. gondii* causa danos irreversíveis nas células macrofágicas, porém o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios estimula a produção da Cx43, que mesmo não conseguindo se inserir na membrana plasmática em células infectadas por conta dos danos no citoesqueleto, pode exercer papéis importantes no processo de manutenção da estrutura celular infectada.

PALAVRAS CHAVES: Junção Comunicante, Macrófagos, *Toxoplasma gondii*.

Abstract

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is the causative agent of toxoplasmosis. This protozoan has the characteristic of being obligate intracellular and having a high prevalence worldwide, where it is believed to have infected one third of the world's population, causing great morbidity and mortality. Given the complexity of this disease, several studies have been dedicated to the study of structures that are associated with parasitic diseases. Among these structures are the Communicating Junctions, which are responsible for the exchange of ions and small messengers that maintain tissue homeostasis. These transmembrane channels play an important role in intercellular communication in different tissues, as they allow communication in different cell types, including macrophages. With this, the morphological and functional characterization of gap junctions in macrophages, and in particular formed by connexin 43, has been the subject of study by several groups, but their regulatory mechanisms still deserve clarification, especially in the face of pathological changes, such as in infectious-inflammatory processes caused by *T. gondii*. In view of this, the main objective of this study was to evaluate the modulation of gap junctions in the macrophage lineage J774-G8, after infection with the parasite *Toxoplasma gondii* and subsequent activation with inflammatory pro-immune factors. As methodology, it was used: (1) Culture of J774-G8 cells; (3) Infection of the culture by the *T. gondii* strain RH; (4) Treatment with individual and conjugated pro-immunoinflammatory factors (IFN- γ , TNF- α , IFN- γ + TNF- α); (5) Immunoelectrophoretic assays (*Western Blot*); and (4) Immunofluorescence assays and analysis by confocal microscopy. The general results found were: (1) Improvement in the morphological profile of cultures of J774-G8 cells infected with *T. gondii* treated with pro-immune-inflammatory factors; (2) Increased Cx43 protein expression in infected J774-G8 cells after treatment with pro-inflammatory immune factors for 24 and 48 hours; (3) Cell activation stimulated by treatment with conjugated factors; (4) The damage to the cellular cytoskeleton caused by the infection was irreversible, even after treatment with inflammatory pro-immune factors in infected cells; (5) Damage to the cytoskeleton prevented the transport and anchoring of Cx43 in the plasmatic membrane, however the factors provided an increase in the cytoplasmic levels of Cx43. With this, it was possible to conclude that: infection with *T. gondii* causes irreversible damage to macrophage cells, however treatment with pro-immune inflammatory factors stimulates the production of Cx43, which even though it fails to insert itself into the plasmatic membrane in infected cells due to damage to the cytoskeleton, may play important roles in the process of maintaining the infected cell structure.

KEYWORDS: Communicating Junction, Macrophages, *Toxoplasma gondii*.

Lista de figuras

Figura 1: Eletromicrografia de músculo cardíaco ventricular do porco.....	18
Figura 2: Modelo esquemático dos componentes da placa juncional.....	20
Figura 3: Organização topológica da proteína juncional (conexina) na membrana plasmática.....	21
Figura 4: Estruturas gerais da composição da conexina e da inoxina.....	22
Figura 5: Diagrama de homologia de aminoácido.....	23
Figura 6: Tipos de conexões e canais juncionais formados por associação de conexinas iguais ou diferentes.....	26
Figura 7: Compatibilidade heteromérica e heterotípica.....	27
Figura 8: Esquema demonstrando a síntese, montagem e degradação das junções comunicantes dentro da célula.....	30
Figura 9: Vias de oligomerização de dois tipos de conexina.....	31
Figura 10: Função das junções comunicantes.....	32
Figura 11: Esquema demonstrando a distribuição das conexinas no coração de mamíferos.....	34
Figura 12: Representação do processo homeostático do íon K+ no interior da cóclea.....	36
Figura 13: Desenho esquemático da localização dos tipos de conexina presentes no néfron.....	38
Figura 14: Ilustração esquemática de três células acopladas em rede e condições fisiológicas.....	40
Figura 15: Mapa do Brasil com 5 regiões e distribuição da população humana, demonstrando fontes de <i>T. gondii</i> isolados genotipados.....	46
Figura 16: Os três estágios infecciosos do <i>T. gondii</i>	48
Figura 17: Esquema do ciclo sexual do <i>T. gondii</i> iniciado com a ingestão do cisto que terá a membrana rompida.....	51
Figura 18: Organização esquemática descrevendo o ciclo de vida do <i>T. gondii</i>	52
Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão de um taquizoíta de <i>T. gondii</i>	53
Figura 20: Desenhos esquemáticos em corte transversal de um taquizoíta de <i>T. gondii</i> indicando as principais estruturas e organelas.....	56
Figura 21: Diagrama simplificado do processo de divisão do <i>T. gondii</i> por endodiogéia.....	59
Figura 22: Desenhos esquemáticos de um bradizoíta de <i>T. gondii</i> em vista longitudinal.....	60
Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura de um esporocisto.....	62
Figura 24: Desenho Esquemático do esporozoíta de <i>T. gondii</i> em vista longitudinal.....	63
Figura 25: Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções.....	69

Figura 26: Organização esquemática demonstrando a ativação do macrófago pelo IFN- γ	71
Figura 27: Micrografia eletrônica de varredura de um macrófago sendo invadido pelo <i>T. gondii</i>	74
Figura 28: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 controle infectadas com o <i>T. gondii</i> (24, 48 e 72 horas) sem o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios.....	90
Figura 29: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) (24, 48 e 72 horas).....	91
Figura 30: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com <i>T. gondii</i> (24 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (24 horas).....	92
Figura 31: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com <i>T. gondii</i> (24 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (48 horas).....	93
Figura 32: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com <i>T. gondii</i> (24 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (72 horas).....	93
Figura 33: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com <i>T. gondii</i> (48 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (24 horas).....	95
Figura 34: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com <i>T. gondii</i> (48 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (48 horas).....	96
Figura 35: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com <i>T. gondii</i> (48 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (72 horas).....	96
Figura 36: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com <i>T. gondii</i> (72 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (24 horas).....	98
Figura 37: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com <i>T. gondii</i> (72 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (48 horas).....	98
Figura 38: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com <i>T. gondii</i> (72 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (72 horas).....	99
Figura 39: Gráfico comparativo do número de células nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 controle (24, 48 e 72 horas) e nas culturas de Linhagem Celular Macrofágicas J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> (24, 48 e 72 horas).....	100
Figura 40: Gráficos comparativos do número de células nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com o <i>T. gondii</i> sem tratamento (Cont) e tratados com IFN- γ nos períodos de 24, 48 e 72 horas..	101

Figura 41: Gráficos comparativos do número de grumos nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com o <i>T. gondii</i> sem tratamento (Cont) e tratados com IFN- γ nos períodos de 24, 48 e 72 horas..	102
Figura 42: Gráficos comparativos do número de células nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com o <i>T. gondii</i> sem tratamento (Cont) e tratados com TNF- α nos períodos de 24, 48 e 72 horas.	104
Figura 43: Gráficos comparativos do número de grumos nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com o <i>T. gondii</i> sem tratamento (Cont) e tratados com TNF- α nos períodos de 24, 48 e 72 horas..	105
Figura 44: Gráficos comparativos do número de células nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com o <i>T. gondii</i> sem tratamento (Cont) e tratados com os fatores pró-imuno inflamatórios IFN- γ +TNF- α nos períodos de 24, 48 e 72 horas.....	107
Figura 45: Gráficos comparativos do número de grumos nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com o <i>T. gondii</i> sem tratamento (Cont) e tratados com IFN- γ +TNF- α nos períodos de 24, 48 e 72 horas..	108
Figura 46: Imagem representativa do experimento de imunoelétrica.....	110
Figura 47: Gráficos densitométricos representativos das bandas observadas na imagem de <i>Western blot</i>	110
Figura 48: Gráfico densitométrico representativos das bandas observadas na imagem de <i>Western blot</i>	111
Figura 49: Imagem representativa do experimento de imunoelétrica.....	112
Figura 50: Gráficos densitométricos representativos das bandas observadas na imagem de <i>Western blot</i>	113
Figura 51: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 controle.....	116
Figura 52: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados por 24 horas.....	118
Figura 53: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados por 48 horas.....	119
Figura 54: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> no período de 24 horas.....	123
Figura 55: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> no período de 48 horas.....	124
Figura 56: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> no período de 72 horas.....	125

Figura 57: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> no período de 24 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 24 horas.....	128
Figura 58: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> no período de 24 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 48 horas.....	129
Figura 59: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> no período de 24 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 72 horas.....	130
Figura 60: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> no período de 48 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 24 horas.....	133
Figura 61: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> no período de 48 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 48 horas.....	134
Figura 62: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> no período de 48 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 72 horas.....	135
Figura 63: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com <i>T. gondii</i> no período de 72 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 48 horas.....	136
Figura 64: Imagem esquemática de um vacúolo parasitóforo (VP) em seção transversal mostrando taquizoítas ligados ao corpo residual.....	144
Figura 65: Esquema demonstrando as proteínas que possivelmente estão envolvidas com a inserção da Cx43 na membrana plasmática.....	147
Figura 66: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da célula muscular epitelial infectada com taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i> com o crescimento de 20 horas, demonstrando a associação do VP, contendo bradizoíta.....	151

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 JUNÇÕES COMUNICANTES.....	17
2.1.1 PROPRIEDADES DAS JUNÇÕES COMUNICANTES	27
2.1.2. FORMAÇÃO DAS JUNÇÕES COMUNICANTES	29
2.1.3 FUNÇÕES DAS JUNÇÕES COMUNICANTES	32
2.1.4 CONEXINA 43	40
2.2 TOXOPLASMOSE	44
2.2.1 CICLO DE VIDA DO <i>Toxoplasma gondii</i>	48
2.2.2 ASPECTOS CELULARES	53
2.2.3 O TAQUIZOÍTA.....	55
2.2.4 O BRADIZOÍTA.....	60
2.2.5 O ESPOROZOITA	61
2.2.6 ASPECTOS CLÍNICOS DA TOXOPLASMOSE	64
2.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO E A INFLAMAÇÃO	67
2.3.1 O Macrófago	72
2.3.2 Macrófago: Função e interação celular	74
2.3.3 MACRÓFAGO: JUNÇÕES COMUNICANTES	77
2.2.3 Junções Comunicantes X Infecção Parasitária X Macrófagos	79
3 MATERIAIS & MÉTODOS	82
3.1. CULTURA DE CÉLULAS DE LINHAGEM MACROFÁGICA J774-G8...	83
3.2 OBTENÇÃO DE TAQUIZOÍTA DE <i>T. gondii</i>	83
3.3 INTERAÇÃO PARASITO-CÉLULA.....	84
3.4. TRATAMENTO COM FATORES PRO IMUNO-INFLAMATÓRIOS	84
3.5. CONTAGEM DE CÉLULAS E GRUMOS CELULARES	84
3.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA	85
3.7. IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA.....	85
3.8. IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	87
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	88
4. RESULTADOS	89

4.1. INFECÇÃO COM O <i>T. gondii</i> : CRESCIMENTO CELULAR E ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	89
4.2. FATORES PRÓ-IMUNOINFLAMATÓRIOS: CRESCIMENTO CELULAR E ASPECTOS MORFOLÓGICOS:	90
4.2.1. INFECÇÃO COM <i>T. gondii</i> 24 HORAS E TRATAMENTO COM OS FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS:	91
4.2.2. INFECÇÃO COM <i>T. gondii</i> 48 HORAS E TRATAMENTO COM OS FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS:	94
4.2.3. INFECÇÃO COM <i>T. gondii</i> 72 HORAS E TRATAMENTO COM OS FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS:	97
4.2.4. MICROAMBIENTE CELULAR INFECTADO X TRATAMENTO COM FATORES: COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA.....	99
4.3. WESTERN BLOTTING.....	108
4.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA	113
5. DISCUSSÃO	137
5.1. CRESCIMENTO CELULAR E ASPECTOS MORFOLÓGICOS: DA INFECÇÃO AO TRATAMENTO	137
5.2. EXPRESSÃO PROTEICA DA Cx43: INFECÇÃO x TRATAMENTO	141
5.3. LOCALIZAÇÃO DA Cx43: ALTERAÇÕES NA INFECÇÃO E NO TRATAMENTO.....	145
6. CONCLUSÃO	155
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158
8. ANEXOS.....	183
8.1. Anexo 1	183
8.2. Anexo 2	184
8.3. Anexo 3	185
8.4. Anexo 4	186

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) é o agente causador da toxoplasmose, esta zoonose possui uma alta prevalência em todo o mundo e é de significativa importância médico-veterinária. Este protozoário possui a característica de ser intracelular obrigatório, e é capaz de infectar e se replicar em células nucleadas.

Toxoplasma gondii é um parasita eucariótico intracelular obrigatório do filo Apicomplexa que infecta até um terço da população global. A soro prevalência do *T. gondii* indicou que o Brasil (56% da população geral) possui 4 vezes mais exposição ao parasita que nos Estados Unidos (13% da população geral).

Apesar da alta prevalência, a doença apresenta-se na maioria dos casos como assintomática, entretanto, em indivíduos com o sistema imune imaturo ou em pacientes imunocomprometidos a infecção pode levar a manifestações clínicas relacionadas a lesões na retina e manifestações severas como encefalites, em casos de infecção congênita pode levar ao óbito.

As junções comunicantes também executam um papel de destaque em estudos associados às infecções parasitárias. Estas junções são canais transmembranares que permitem a comunicação direta entre as células dos tecidos.

As junções comunicantes são formadas por uma família multigênica de proteínas transmembranares denominadas conexinas. Fazem parte da família destas proteínas 21 conexinas em humanos. As conexinas compõem diversos sistemas fisiológicos, e estudos recentes têm ajudado a compreender o papel da conexina 43 (Cx43) em macrófagos.

A caracterização morfológica e funcional das junções comunicantes em macrófagos, e em particular formada pela conexina 43 (proteína presente neste sistema) tem sido alvo de estudo de diversos grupos, pois possui um papel-chave na homeostase dos tecidos, na inflamação e reparação tecidual, bem como na hematopoiése, no entanto, seus mecanismos regulatórios ainda merecem esclarecimentos, principalmente diante de alterações patológicas, como nos processos infecto-inflamatórios causados pelo *T. gondii*.

Vários estudos têm indicado o envolvimento de junções comunicantes na interação entre as células do sistema imunológico. Sabe-se que algumas células do sistema imunológico apresentaram junções comunicantes funcionais, como

células de micróglia de camundongos e monócitos/macrófagos oriundos do sangue de humano. Posteriormente foi observado que células de monócitos/macrófagos mesmo após 24 horas de incubação com interferon- γ + TNF- α e interferon- γ + lipopolissacarídeo (LPS) apresentavam a expressão da Cx43.

Os estudos envolvendo moléculas relacionadas à resposta imune mostram que estas podem influenciar a expressão de junções comunicantes, como demonstrado por Handel (2007).

Estudos da interação de macrófagos com *T. gondii* vem demonstrando que o parasita também possui capacidade de inibir a ativação de macrófagos. Seabra *et al.*, 2002 demonstrou que macrófagos de camundongo ativados com IFN- γ e LPS infectados com taquizoítas de *T. gondii* tem a produção de NO inibida devido à redução da expressão da iNOS em macrófagos infectados.

Com isto, indagamos como estruturas de caráter juncional em células macrofágicas associadas com o sistema imunológico se comportam no processo infecto-inflamatório causado pelo *T. gondii* e se existe a possibilidade de uma via de proteção contra a infecção com o *T. gondii* através da ativação macrofágica com tratamento com os fatores pró-imuno-inflamatórios, após o contato da célula com o *T. gondii*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 JUNÇÕES COMUNICANTES

O início da descrição das junções comunicantes ocorreu no final da década de 50 por Furshpan e Potter (1959), estes pesquisadores apresentaram os primeiros indícios de comunicação intercelular com os dados que evidenciaram o acoplamento elétrico em neurônios de lagostim.

Outros trabalhos demonstraram o acoplamento elétrico em outros tipos celulares, porém sem afirmar que a junção comunicante seria responsável por tal fenômeno. No final dos anos 60, experimentos de microscopia eletrônica de transmissão em amostras tratadas previamente com nitrato de lantânia permitiram a visualização de estruturas heptalaminares, apresentando um padrão hexagonal de subunidades de 7 a 8 nm de diâmetro, e com espaços de aproximadamente 2 nm entre as membranas das células adjacentes (REVEL e KARNOVSKY, 1967). Essa evidência foi crucial para a distinção entre as Junções do tipo *Tight* e os canais que realmente conseguiram conduzir estes sinais elétricos, bem como para o estabelecimento do termo “GAP” (fenda, em inglês) utilizado atualmente.

Em 1970 Uehara e Burnstock apresentaram uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão com uma estrutura que os autores descreveram como “precisa e localizada na maior aproximação das membranas de células musculares lisas”, sendo semelhante a uma fusão entre as membranas, mas na verdade se tratavam de uma junção “Gap”, Figura 1.

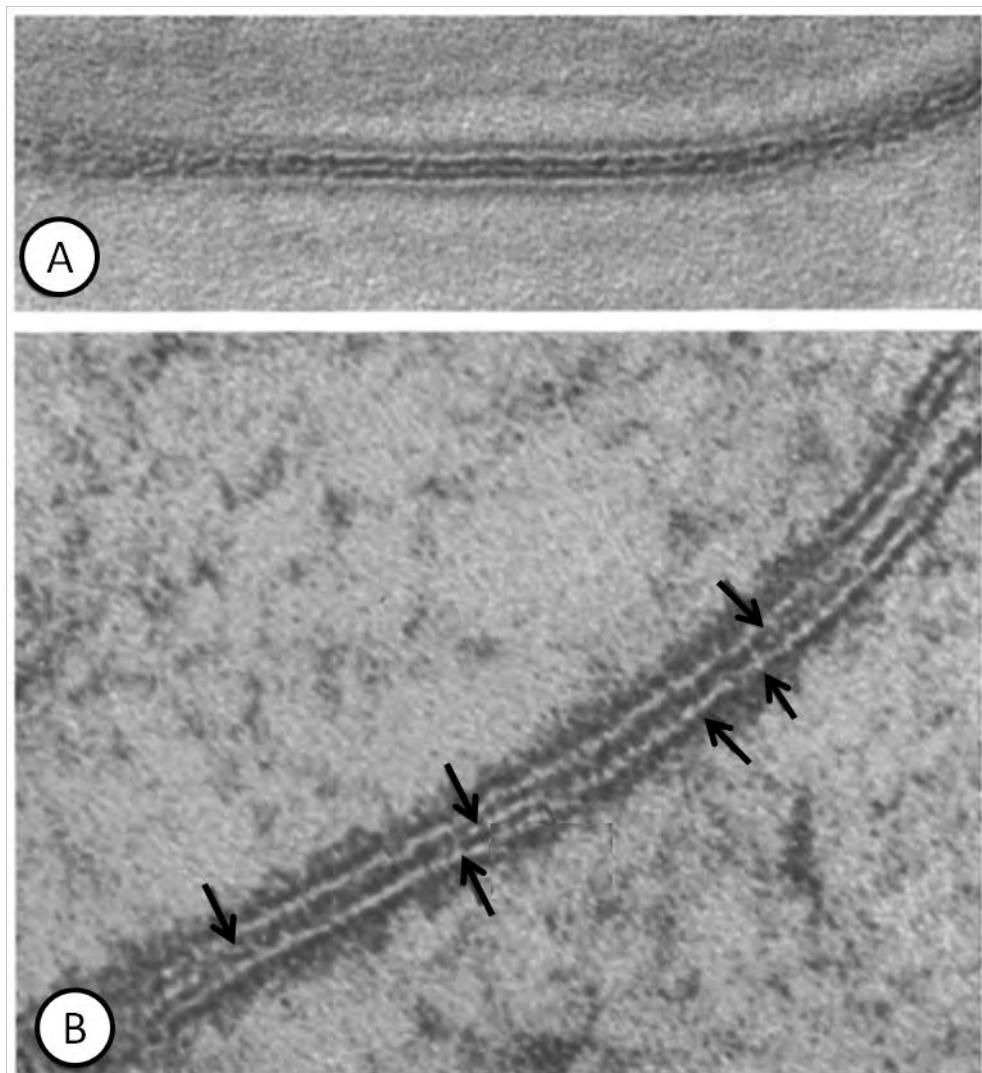


Figura 1: Eletromicrografia de músculo cardíaco ventricular do porco. Região de ligação entre as membranas, representada por uma junção gap. Aumento de 300.000 X (UEHARA e BURNSTOCK, 1970)

Utilizando técnicas de difração de raios X, a estrutura juncional foi melhor elucidada (MAKOVSKI *et al.*, 1977). As observações demonstraram que o canal era formado por seis monômeros que formam um poro de diâmetro de 1,5 nm, permitindo que através do alinhamento dos hemicanais na membrana ocorra a comunicação entre as membranas das células adjacentes, como mostrado na Figura 2 (LAIRD, 2006; GOODENOUGH e PAUL, 2009; KOVAL *et al.*, 2014; LAIRD, 2014).

Os hemicanais alinhados adquirem um formato tubular atingindo um comprimento total de 100 – 150 Å, estando nas membranas das células a uma distância de aproximadamente 20 Å (DHEIN, 1998). Após os achados

morfológicos, a correlação das junções com o acoplamento elétrico se tornou mais evidente (GILULA *et al.*, 1972).

Sendo assim, as junções comunicantes são canais transmembranares localizados na fenda extracelular (GIEPMANS, 2004), que exercem um importante papel na comunicação intercelular em diferentes tipos celulares e em diferentes tecidos (FORTES *et al.*, 2004), pois permitem a comunicação bidirecional (BERMUDEZ-FAJARDO *et al.*, 2007), direta do citoplasma de duas células vizinhas. Além de ser uma via de baixa resistência para propagação de impulsos elétricos em mamíferos, o canal juncional permite o tráfego de moléculas de até 1 kDa (FLAGG-NEWTON *et al.*, 1979; KOVAL *et al.*, 2014), possibilitando o intercâmbio de íons e substâncias como aminoácidos, nucleotídeos, ATP, AMPc e segundos mensageiros, o que pode ser observado na propagação de ondas de Ca^{2+} dependentes de *inositol trifosfato* (IP3) (BENNETT *et al.*, 1991; DHEIN, 1998; GIEPMANS, 2004; NEIJSEN *et al.*, 2007).

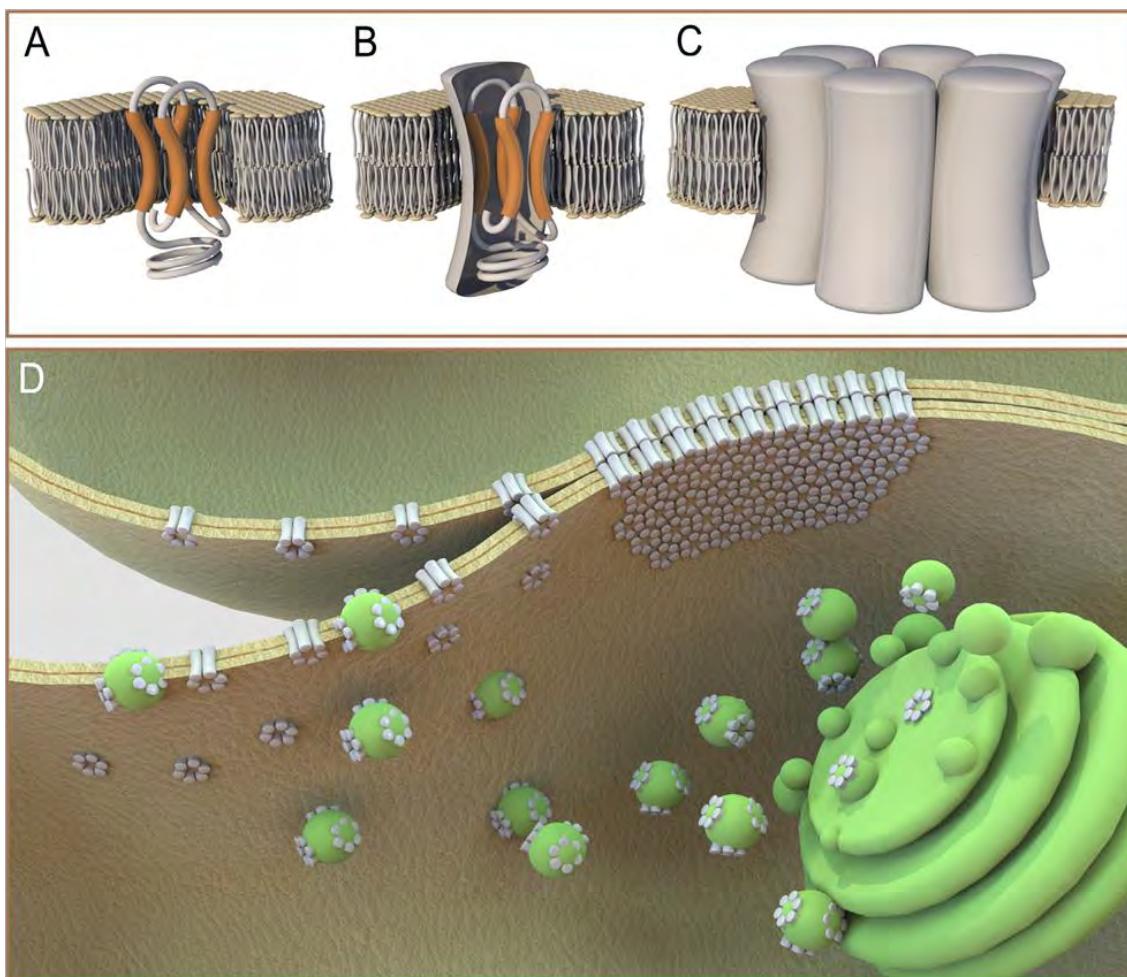


Figura 2: Modelo esquemático dos componentes da placa juncional. Em A observamos a estrutura molecular de um connexon destacando as quatro porções transmembranares. Em B destaca-se a esquematização desta estrutura unitária que é sintetizada no Reticulo endoplasmático. A conexina oligomerizada e organizada em hexamero é vista em C formando um connexon, e em D a figura mostra o transporte dos connexons armazenados no complexo de Golgi sendo transportados para a membrana celular por vesículas formando um canal quando conectam-se com connexons de uma célula adjacente, estes seguem para se agrupar formando a placa juncional (LAIRD, 2014).

Em vertebrados as juncções comunicantes são formadas por uma família multigênica de proteínas transmembranares denominadas conexinas e em invertebrados, essas juncções são formadas por proteínas das família de inexinas (NEIJSEN *et al.*, 2007; SÁNCHEZ *et al.*, 2019). As inexinas em *Arthropoda*, *Nematoda*, *Annelida* e *Cnidaria*, desempenham diversas funções, como resposta imune, apoptose e desenvolvimento e comportamento do embrião, dentre outros (GUIZA *et al.*, 2018).

As conexinas são divididas em nove domínios estruturais, que podem ser vistos na Figura 3. São quatro domínios transmembrana apresentando uma

estrutura em α -hélice (TM1, TM2, TM3 e TM4); uma porção C-terminal; uma porção N-terminal; duas alças extracelulares (E1 e E2); uma alça intracelular ou citoplasmática entre as regiões transmembrana 2 e 3, caracterizada por representar a região de menor similaridade e menor conservação entre as conexinas (AC) (KUMAR e GILULA, 1996; HERVE *et al.*, 2004).

Os domínios transmembranares e as alças extracelulares são as regiões que apresentam maior conservação filogenética entre os integrantes da família das conexinas, enquanto que o domínio carboxi-terminal e os demais apresentam pouca conservação filogenética (BENNETT *et al.*, 1991; DHEIN, 1998). Por ser a região mais anfipática, o domínio transmembrana 3 constitui a região central do canal juncional, formando as paredes do canal (UNGER, 1999).

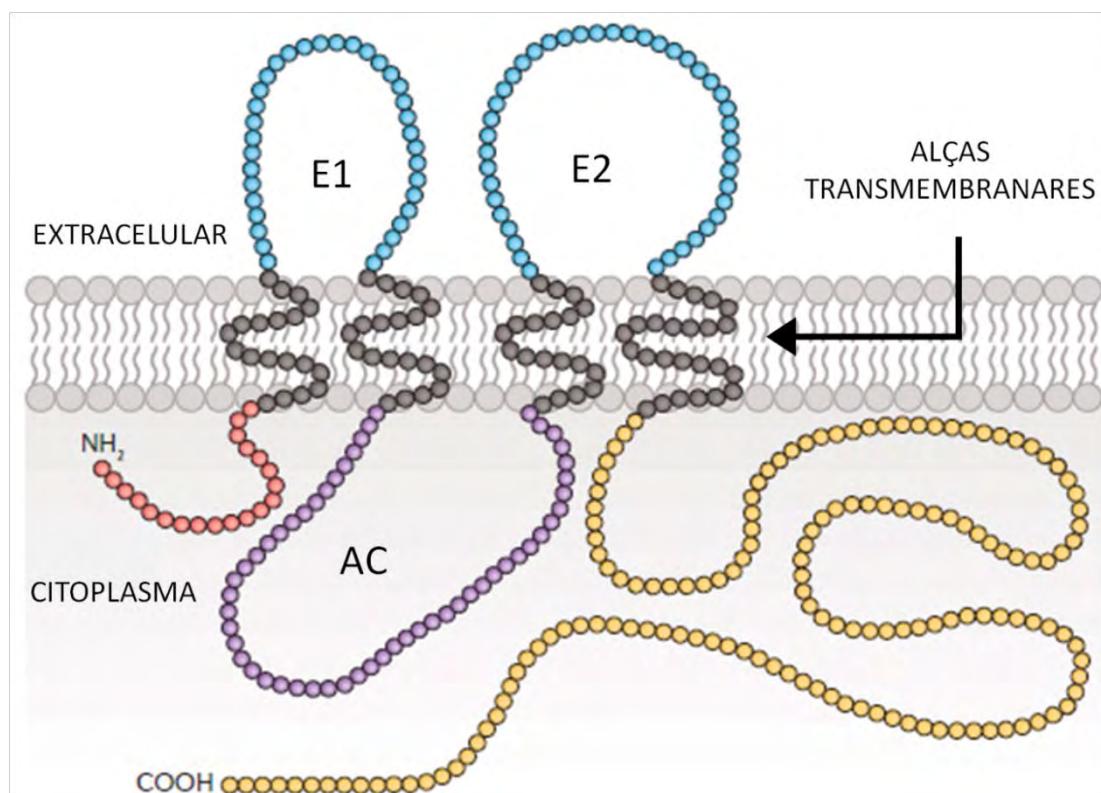


Figura 3: Organização topológica da proteína juncional (conexina) na membrana plasmática. Descrição dos 9 domínios estruturais da conexina na membrana plasmática lido da esquerda para a direita. Porção amino-terminal localizada no citoplasma (NH₂), domínio transmenbranar 1, alça extracelular 1 (E1), domínio transmembranar 2, alça citoplasmática (AC), alça transmembranar 3, alça extracelular 2 (E2), domínio transmembranar 4 e porção carboxi-terminal (COOH) (Adaptado: LAIRD e LAMPE, 2018).

As junções celulares são estruturas fundamentais para todos os organismos vivos. Nos invertebrados as inexinas são estruturas semelhantes às conexinas e ao compará-las observamos que ambas são compostas de hemicanais que consiste principalmente de um arranjo hexamérico de monômeros de conexina ou inexina que formam um canal cilíndrico com um poro axial central, cujo acoplamento produz uma junção intercelular funcional com variação nas suas isoformas, tendo como principal diferença molecular entre as inexinas e as conexinas, o número de cisteínas na sua composição, como mostrado na Figura 4 (KRISTAN *et al.*, 1988; OSHIMA *et al.*, 2016; SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

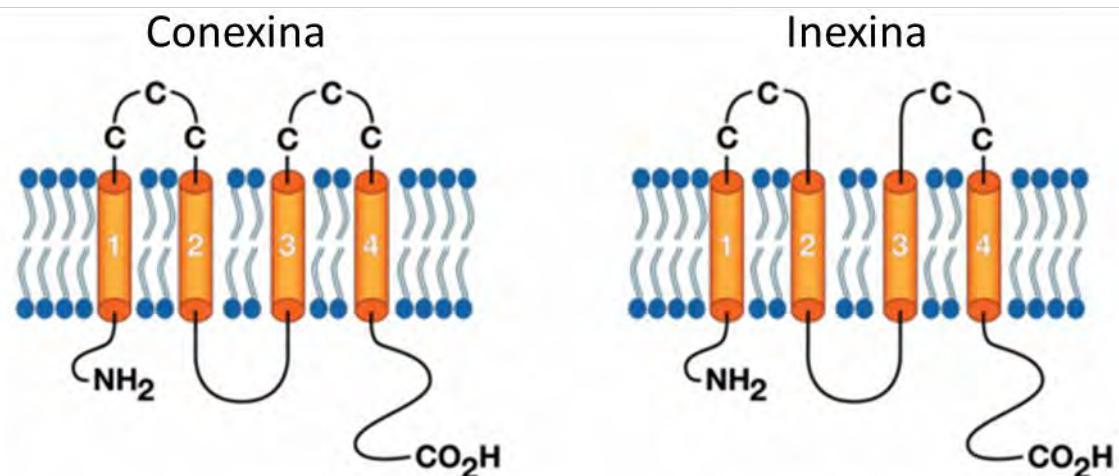


Figura 4: Estruturas gerais da composição da conexina e da inexina. A conexina (esquerda) presente em vertebrados, possui três porções de cisteína em cada alça extracelular, enquanto em invertebrados as inexinas (direita) possuem duas cisteínas por alça. Ambas as estruturas têm quatro domínios transmembranares (tubos laranja) conectados por uma alça citoplasmática, e a porção carboxi-terminal e amino-terminal no citosol.

As conexinas podem ser diferenciadas pelos parâmetros dos pesos moleculares, em kDa que varia entre 25 e 62 kDa, advindos das sequências de DNA complementar (cDNA), sendo assim a conexina 43 possui 43 kDa (NEIJSSEN *et al.*, 2007).

Com isto, as conexinas estão divididas em dois ramos filogenéticos: Grupo I, formado por conexinas com um peso molecular menor que 32 kDa; Grupo II, constituído por conexinas com peso molecular igual ou maior que 32 kDa (BENNETT *et al.*, 1995; DHEIN, 1998; SOSINSKY e NICHOLSON, 2005).

Estas proteínas também são classificadas nos subgrupos α e β de acordo com a similaridade entre determinadas regiões da sequência protéica primária da conexina (GIMLICH *et al.*, 1990; WILLECKE *et al.*, 2002; SEGRETAIN e FALK, 2004) Com isso, a sua nomenclatura ainda pode ser codificada pela família dos genes relacionados a sua síntese a partir do mapeamento de quatro genes funcionais (α_1 , β_1 , β_2 e α_3). Assim, os respectivos nomes para conexina 43, conexina 32 e conexina 46, por exemplo, são GJA1, GJB1 e GJA3 (HSIEH *et al.*, 1991; KUMAR e GILULA, 1996; MEŞE *et al.*, 2007). A Figura 5 apresenta a homologia entre os diferentes tipos de conexinas identificados até o momento de acordo com o mapeamento genético dos mesmos.

Até o momento foram relatados 21 tipos de conexinas em humanos e 20 tipos de conexinas em roedores (Tabela 2) (SOHL e WILLECKE, 2004; HERVE, 2005; SÁNCHEZ *et al.*, 2019, LAIRD e LAMPE, 2022). Em humanos o gene está localizado no cromossomo 6q22-q23 (Paznekas *et al.*, 2003).

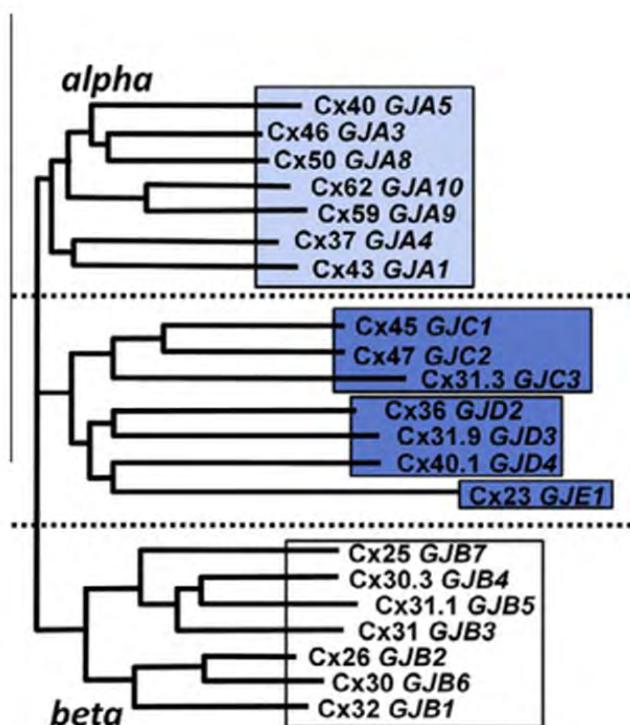


Figura 5: Diagrama de homologia de aminoácido. É apresentado o índice de similaridade das famílias das conexinas com os nomes de proteínas de conexina humana e os nomes de genes (KOVAL *et al.*, 2014).

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

Tabela 1: Família multigênica das conexinas (SOHL e WILLECKE, 2003).

Na membrana plasmática as conexinas estão dispostas em hexâmero formando o hemicanal juncional, chamado de conexon, esta organização topológica de membrana é característico e semelhante para todos os subtipos de conexinas (MAKOVSKI *et al.*, 1977; DERMIETZEL e SPRAY, 1993; KUMAR e GILULA, 1996; WHITE *et al.*, 1999; UNGER *et al.*, 1999; SEGRETAIN e FALK, 2004; LILY *et al.*, 2016). Estes conexons uma vez localizados na membrana podem interagir de forma não covalente com o conexon da célula adjacente, formando então um canal juncional completo (BENNETT *et al.*, 1991).

Com isto, doze conexinas interagem entre si para formar um canal juncional, sendo que seis conexinas se organizam em um hexâmero na membrana plasmática de uma célula. Uma vez paralelo com a célula adjacente, o conexon pode se alinhar e a outro conexon e formar o canal juncional (KOVAL *et al.*, 2014). Este canal só se torna funcional quando ligado, permitindo a passagem de substâncias de até 1 kDa (FORTES *et al.*, 2004).

O conexon pode ser classificado de acordo com a sua composição: quando constituído de conexinas iguais, por exemplo, todas formadas pela conexina 43 (Cx43), são chamados de conexons homoméricos, e quando a sua

composição possui conexinas diferentes são chamados de conexons heteroméricos (WANG e PERACCHIA, 1998; LILY *et al.*, 2016).

O hemicanal também é classificado de acordo com sua composição, este leva em consideração a relação ao canal juncional completo, podendo ser classificado como: homotípico e heterotípico, respectivamente, quando as conexinas dos conexons pareados pertencem à mesma família ou famílias diferentes (MEŞE *et al.*, 2007; KOVAL *et al.*, 2014).

Sendo assim toda a estrutura do hemicanal pode ser classificada pela sua composição, sendo: (1) homomérico – homotípico, no qual o canal é constituído por dois conexons idênticos formados pela mesma conexina; (2) homomérico–heterotípico, em que o canal é formado por dois conexons diferentes, sendo cada conexon formado pela mesma conexina; (3) heteromérico – homotípico, em que o canal é formado por dois conexons iguais que são constituídos por conexinas diferentes, estando as conexinas de um conexon alinhadas com conexinas de mesmo tipo no outro conexon; (4) heteromérico – heterotípico ou biheteromérico, onde o canal é formado por dois conexons diferentes constituídos por conexinas diferentes, e estes alinhados com conexinas diferentes do outro conexon (KUMAR e GILULA, 1996; MEŞE *et al.*, 2007); e (5) monoheteromérico, onde apenas um dos conexons é heteromérico (Figura 6) (SOSINSKY, 1999; KOVAL *et al.*, 2014).

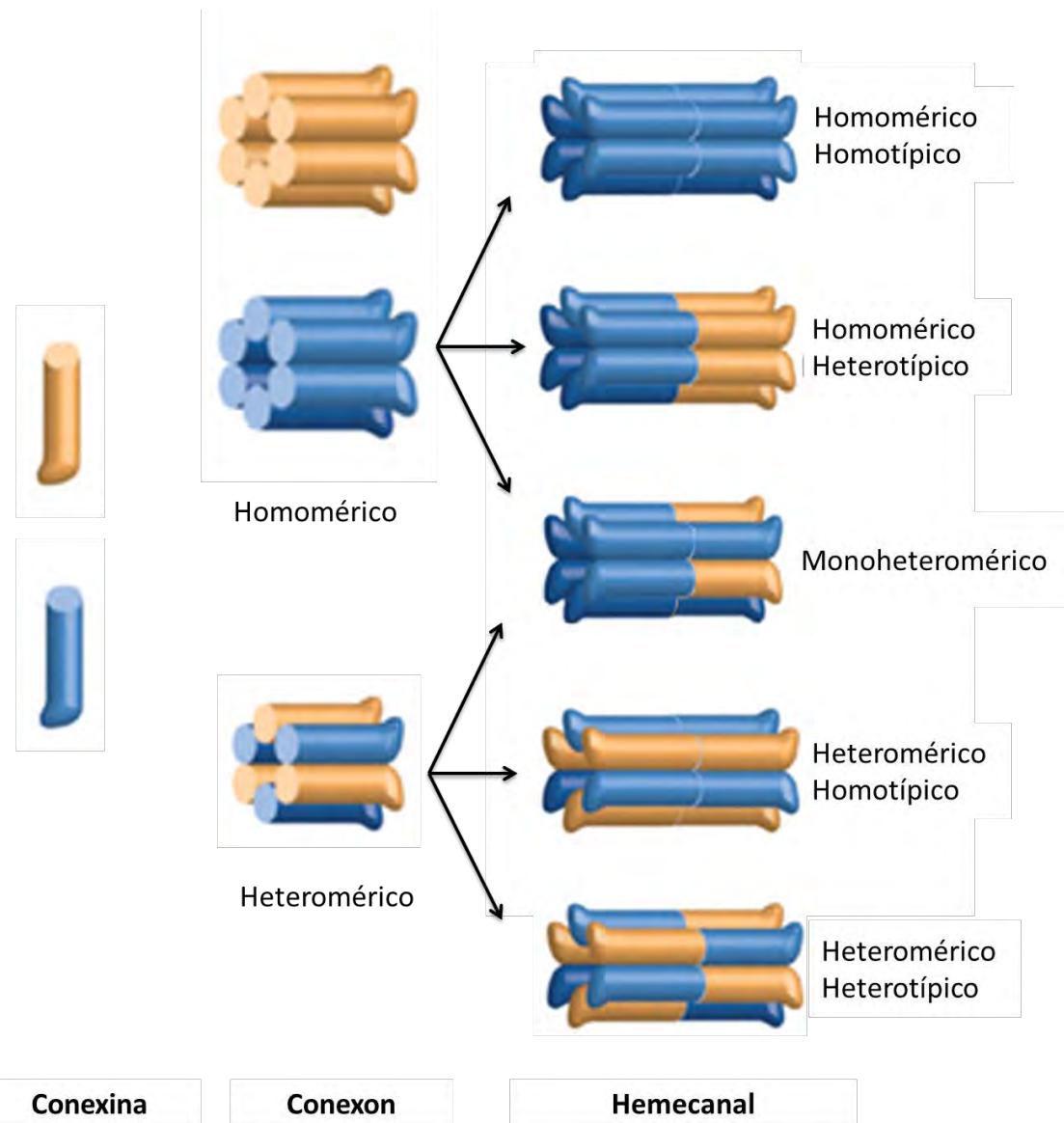


Figura 6: Tipos de conexons e canais juncionais formados por associação de conexinas iguais ou diferentes. Seis conexinas são oligomerizadas para formar um conexon que pode ser classificado em homotípico e heterotípico para formar os canais que quando alinhados podem interagir seletivamente entre si para formar canais homotípicos e heterotípicos, que diferem em seu conteúdo e disposição espacial das subunidades de conexina, um conexon homomérico pode interagir com um heteromérico formando o canal monoheteromérico. (modificado de Meşe *et al.*, 2007 acrescido do esquema proposto por Sosinsky, 1999).

A hetero-oligomerização é um processo regulado que atua diretamente na regulação da função desempenhada pelos hemicanais na fisiologia humana alterando a afinidade para diferentes substâncias (KOVAL *et al.*, 2014), mas nem todas as combinações das isoformas são compatíveis, com isto a Figura 7 fornece um guia razoável para a compatibilidade heteromérica entre conexinas.

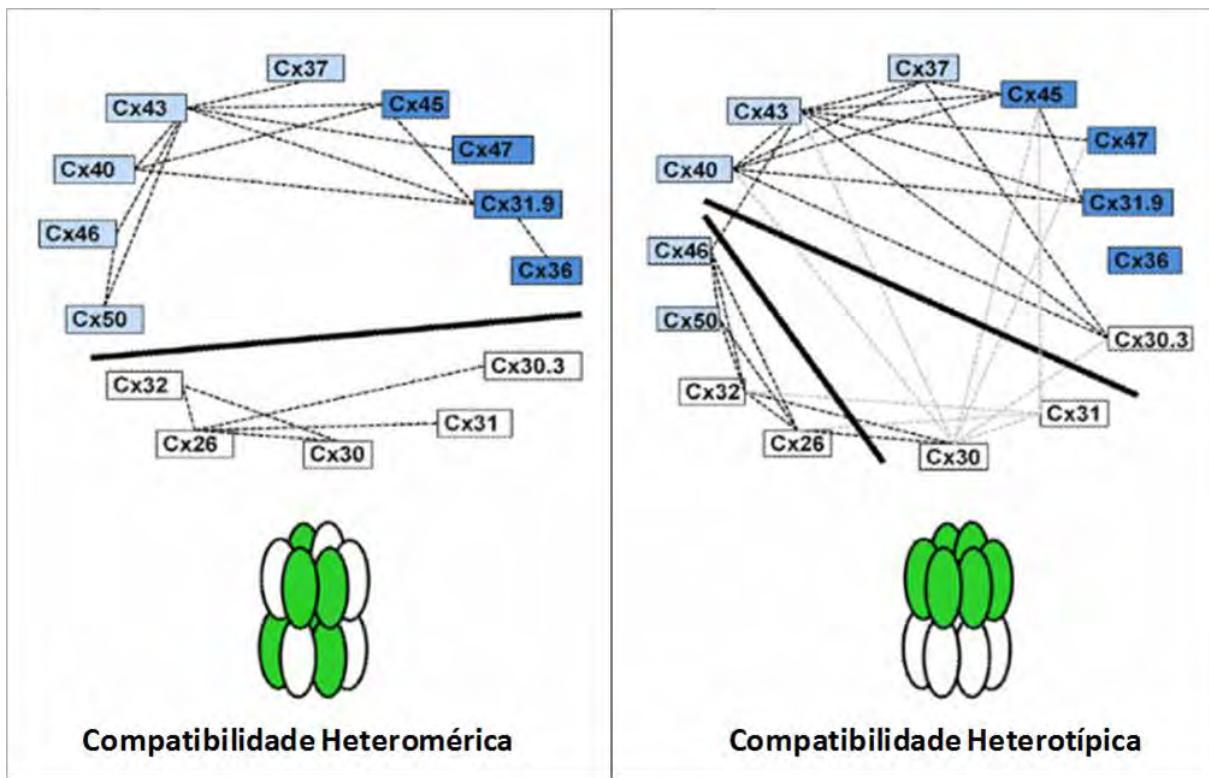


Figura 7: Compatibilidade heteromérica e heterotípica. Interações indicadas pelo diagrama apontam onde há conexinas conhecidas por formarem canais heteroméricos, e estas estão ligadas por linhas tracejadas. A linha de divisória sólida separa as conexinas para indicar a falta de compatibilidade heteromérica (esquerda). Interações heterotípicas foram indicadas pelo diagrama onde conexinas conhecidas por formarem canais heteroméricos são conectadas por linhas tracejadas. Existem dados conflitantes sobre os canais heterotípicos Cx30 e Cx31. As linhas sólidas mostram três grupos de compatibilidade que não se alinham com os grupos de aminoácidos totais (KOVAL *et al.*, 2014),

2.1.1 PROPRIEDADES DAS JUNÇÕES COMUNICANTES

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

Como descrito no protocolo de Dhein (1998), para a realização do experimento, uma das células tem seu potencial de membrana mantido em um valor fixo que se chama potencial de *holding*, que pode estar em -40 mV, por exemplo, enquanto a outra célula do par tem seu potencial modificado ao longo do experimento, variando de -90 mV a +10 mV.

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

Vários fatores podem influenciar a condutância 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 (BENNETT *et al.*, 1991). Já em canais heterotípicos a mudança da condutância juncional depende de qual das duas células do par analisado terá a voltagem alterada (WERNER *et al.*, 1989).

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

As vias relacionadas a proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA), proteína quinase G (PKG), MAP-quinase e tirosina quinases estão relacionadas com a regulação das junções comunicantes (DHEIN, 1998). Destacando a via da PKA, muitos estudos têm observado que a estimulação desta via pode aumentar o acoplamento de junções comunicantes formadas por conexina43 em cardiomiócitos (BURT e SPRAY, 1988).

Outros fatores podem influenciar a condutância das junções comunicantes além destes já citados, como por exemplo, alguns íons: Ca^{2+} , Mg^{2+} e H^+ . Concentrações elevadas de Ca^{2+} em cardiomiócitos proporcionam a diminuição do acoplamento elétrico celular (LOEWENSTEIN, 1966), mas se o pH intracelular for mantido constante esta resposta não ocorre, sugerindo uma ação sinérgica entre H^+ e o Ca^{2+} (NOMA e TSUBOI, 1987). O aumento das concentrações intracelulares de Mg^{2+} também leva ao desacoplamento celular,

porém em concentrações maiores do que os níveis fisiologicamente toleráveis (NOMA e TSUBOI, 1987; PERACCHIA, 2004).

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

2.1.2. FORMAÇÃO DAS JUNÇÕES COMUNICANTES

As conexinas são sintetizadas pelos ribossomos no retículo endoplasmático, sendo co-traduzidas integralmente na membrana do retículo endoplasmático rugoso (LOEWENSTEIN, 1981; SEGRETAIN e FALK, 2004; LAIRD, 2006; LILY *et al.*, 2016). Ainda no retículo endoplasmático rugoso, a conexina é fosforilada, podendo ser oligomerizada e transportada para o complexo de Golgi, outra opção é que a proteína também pode ser primeiramente transportada e só depois oligomerizada no complexo de Golgi (SARMA *et al.*, 2001; SEGRETAIN e FALK, 2004; KOVAL *et al.*, 2014). Após a oligomerização, a conexina forma o hexâmero, chamado de conexon (dentro de vesículas exocíticas) que é transportado do complexo de Golgi até a membrana plasmática da célula, através de microtúbulos (Figura 8) (MUSIL e GOODENOUGH, 1993; DHEIN, 1998, GAIETTA *et al.*, 2002; SEGRETAIN e FALK, 2004; LAIRD 2006).

Através de ensaios com a proteína recombinante Cx43, utilizando técnicas de microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão, Gaietta e colaboradores (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.

Ao longo deste processo acredita-se que a integridade da conexina e do estado oligomerizado do conexon seja mantido por ligações não covalentes,

sugerindo-se a existência de pontes dissulfeto intramoleculares e não intermoleculares (JOHN e REVEL, 1991; LAIRD, 2006).

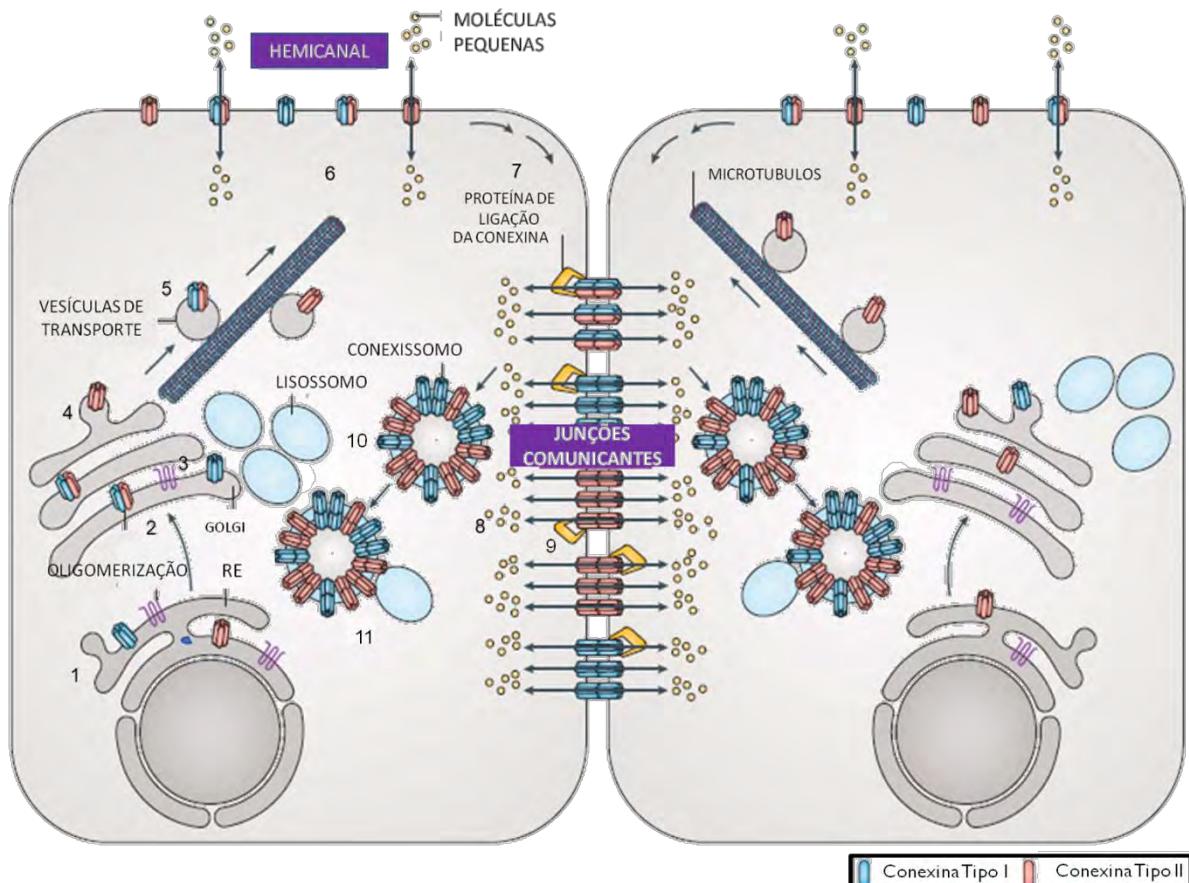


Figura 8: Esquema demonstrando a síntese, montagem e degradação das junções comunicantes dentro da célula. A sequência se inicia com a síntese da conexina no retículo endoplasmático (RE) (1), ocorre a oligomerização (2) e a passagem do RE para o complexo de Golgi (3) onde é armazenado (4) até o direcionamento para a membrana através de microtúbulos (5) e a inserção na membrana plasmática (6). Uma vez inseridos na membrana ocorre a difusão lateral (7) para a formação da placa de junções comunicantes (8) que são mantidas por proteínas do citoesqueleto celular (9). Quando as junções são renovadas, as antigas são retiradas das membranas por vesículas endocíticas (10) e degradadas por lisossomos e proteossomos (11) (Adaptado: LAIRD e LAMPE, 2018).

Em contraste com a maioria das proteínas do complexo juncional, a Cx43 é estabilizada como monômeros no retículo endoplasmático e só se oligomeriza após o transporte para o complexo de Golgi (Figura 9). Parte desta via é regulada pela proteína de controle, ERp29, que se liga ao segundo domínio de extracelular e estabiliza uma conformação que favorece a Cx43 monomérico (KOVAL *et al.*, 2014).

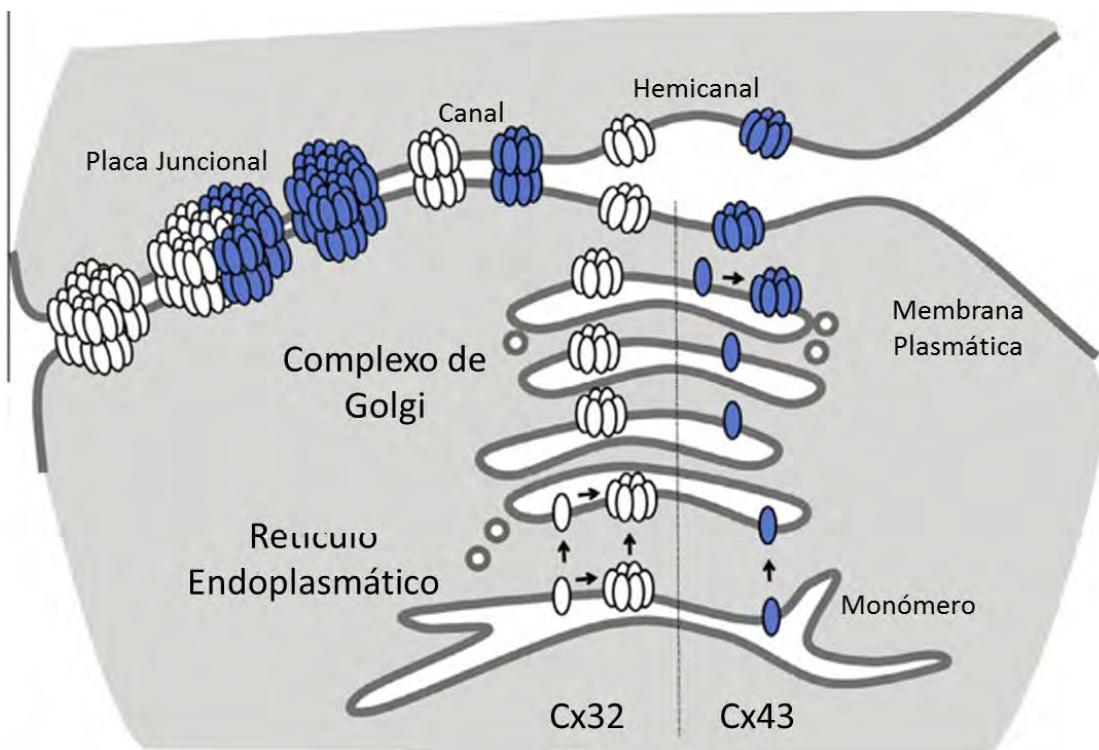


Figura 9: Vias de oligomerização de dois tipos de conexina. As conexinas são inseridas de forma co-traducional na membrana do retículo endoplasmático. Dependendo do subtipo de conexina, a oligomerização pode ocorrer no próprio retículo endoplasmático (Cx32) ou no complexo de Golgi (Cx43). Uma vez oligomerizados, eles são direcionados a membrana celular, formando os hemicanais, que quando paralelo com o hemicanal da célula adjacente formam os canais intercelulares. Estes canais na membrana plasmática unidos em matrizes conhecidas como placas de juncional que pode conter de dezenas a milhares de canais. As placas podem ser homogêneas (compostas de uma única conexina) ou heterogêneas (composta por conexinas heteroméricas) (KOVAL *et al.*, 2014).

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

2.1.3 FUNÇÕES DAS JUNÇÕES COMUNICANTES

Com exceção de alguns tipos celulares como: eritrócitos, trombócitos, fibras musculares esqueléticas maduras e espermatozoides, as junções comunicantes estão presentes em todos os tipos de células de vertebrados (WILLECKE *et al.*, 2002).

As junções comunicantes possuem como característica principal permitir que os citoplasmas de células adjacentes, troquem íons e pequenos mensageiros e esta troca de informações é necessária para a manutenção da função de diversos tecidos (FLAGG-NEWTON *et al.*, 1979; HERVE *et al.*, 2004).

Com isto, estes canais também possuem papel na sinalização autócrina e parácrina fornecendo um caminho para a liberação de ATP (DALE, 2008), glutamato (YE *et al.*, 2003), NAD⁺ (BRUZZONE *et al.*, 2001) e prostaglandinas (CHERIAN *et al.*, 2005) como mostrado na Figura 10. Sendo assim, as conexinas desempenham funções mesmo que não estejam formando a junção comunicante, de modo que o hemicanal não conectado desempenha a função de sinalização autócrina (MORENO, 2004).

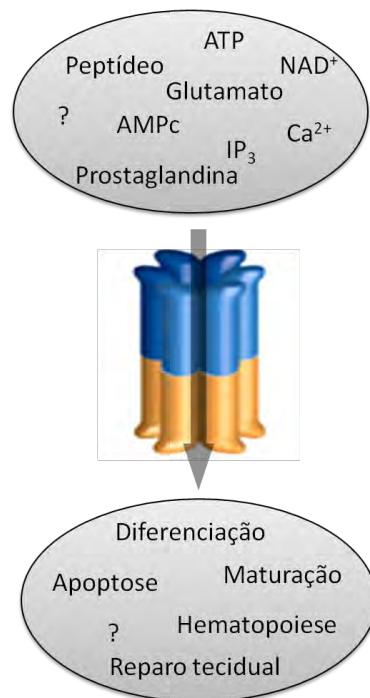


Figura 10: Função das junções comunicantes. As junções comunicantes promovem a difusão passiva de pequenas moléculas e peptídeos envolvidos em diversos processos como maturação e diferenciação celular, morte celular apoptótica, hematopoiese e reparo tecidual, dentre outros papéis não relatados até o momento (modificado de Neijssen *et al.*, 2007 acrescido das informações de BRUZZONE *et al.*, 2001; CHERIAN *et al.*, 2005).

Nos tecidos as funções das conexinas variam de acordo com o papel desempenhado pelo tecido no organismo e o tipo celular que o compõe, participando de processos como: a homeostase de diversos tecidos; a mediação de processos inflamatórios; reparo tecidual; hematopose; secreção de insulina pelas células beta do pâncreas; coordenação da propagação de ondas de cálcio em células do tecido cardíaco; contribuição para a atividade cardiovascular e neural, regulação de fatores carcinogênicos, dentre outros (Tabela 2) (CAO *et al.*, 1997; CHANSON *et al.*, 2005; KAR *et al.*, 2012).

Função	Órgão
Morte celular	Cérebro, ouvido interno, rim, fígado
Diferenciação	Osso, cérebro, ouvido interno, coração, ovário, pulmão, fígado
Proliferação / sobrevivência	Cérebro, osso, coração, ovário, testículos, fígado
Condução iônica	Cérebro, ouvido interna, coração, rim, pulmão, fígado
Acoplamento metabólico	Cérebro, fígado
Difusão de 2º mensageiro	Ouvido interno, Ovário, pulmão, fígado
Proteção de lesão	Coração
Pré-condicionamento	Cérebro, coração
Sinalização extracelular	Osso, cérebro, rins, ovário, pulmão, fígado
Resposta de estimulação mecânica	Osso, ovário

Tabela 2: O papel desempenhado por junções comunicantes em alguns órgãos. Modificado de KAR *et al.* (2012)

Em tecidos cardíacos as junções comunicantes possuem um papel fundamental para a propagação de impulsos elétricos e a orientação do ritmo cardíaco (YEAGER, 1998; MORENO, 2004; SEVERS *et al.*, 2008). Esta estrutura representa uma via de baixa resistência elétrica, facilitando a propagação do impulso elétrico e permitindo o sincronismo de contração cardíaca responsável pelo bombeamento de sangue (WEIDMANN, 1972), mas possui outros papéis, sendo essencial para a remodelação cardíaca após um infarto (SCHWANKE *et al.*, 2002).

Como citado anteriormente, a diversidade de expressão dessas proteínas permite a montagem de canais heteroméricos, e no coração as principais conexinas existentes são a Cx40, Cx43 e Cx45; no entanto a Cx43 é a predominante, como visto na Figura 11 (KAR *et al.*, 2012). Exemplificando,

camundongos deficientes em Cx43 morrem no período pós-natal como resultado de arritmia ventricular (REAUME *et al.*, 1995).

As diferentes combinações formadas pela conexinas existentes no tecido estão relacionadas com a modulação das atividades do tecido cardíaco, levando a diferentes propriedades de condução elétrica e, influenciando o sincronismo dos batimentos (MORENO, 2004; KAR *et al.*, 2012).

Seu papel na vasculatura do organismo facilita a comunicação entre as células que constituem a parede do vaso sanguíneo e coordena a regulação do tônus vascular, assim o acoplamento de células musculares lisas vasculares pode ser responsável pela contração síncrona de pequenos vasos sanguíneos (WILLECKE *et al.*, 2002).

O acúmulo intracelular de Na^+ e a perda de K^+ desempenham papéis importantes na patogênese das arritmias e lesões no coração isquêmico. Kondo *et al.* (2000) mostram eletrofisiologicamente que a remoção de íons Ca^{2+} extracelular permitem a ativação de corrente não seletiva que pode ter um papel na alteração dos fluxos iônicos, promovendo arritmias e infarto do miocárdio.

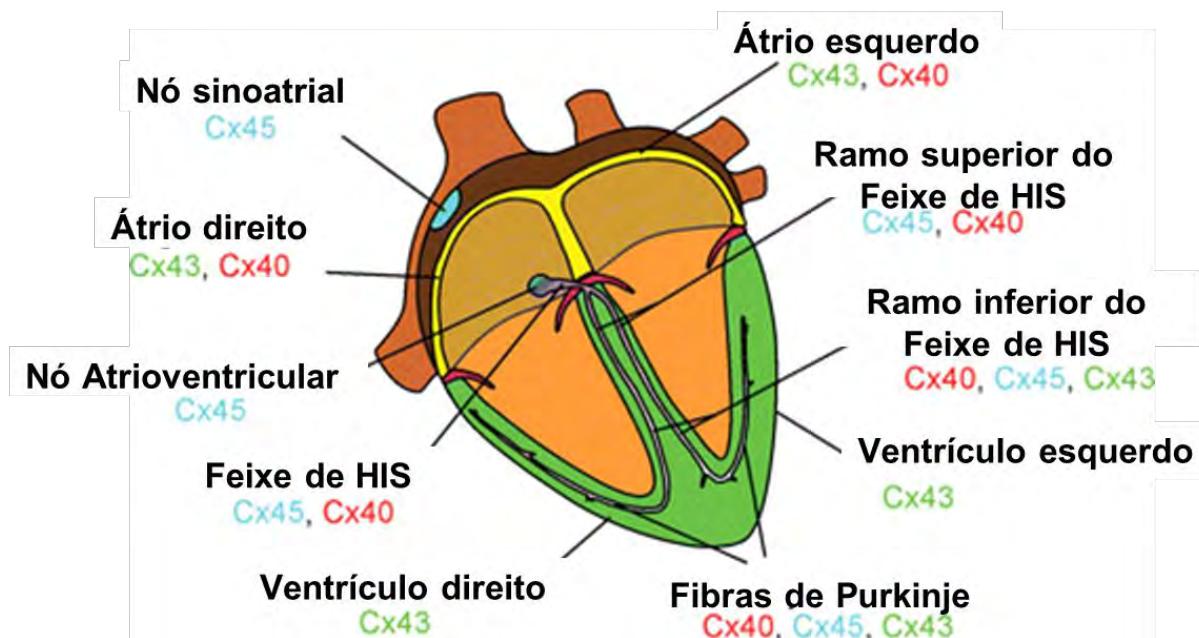


Figura 11: Esquema demonstrando a distribuição das conexinas no coração de mamíferos. Observa-se a distribuição de conexinas em todo o sistema de condução elétrica do coração, determinando a sincronicidade do órgão (SEVERS *et al.*, 2008).

No sistema nervoso temos um sistema complexo de células interligadas através de junções comunicantes que são expressas tanto em neurônios quanto em células gliais (CHEW *et al.*, 2010; KAR *et al.*, 2012), participando dos

processos cognitivos como: percepção, memória e aprendizagem (SÖHL *et al.*, 2005), assim como na neurogênese, migração celular, desenvolvimento neuronal, diferenciação e morfogênese (KAR *et al.*, 2012). Sendo alterado sob condições inflamatórias em cultura de astrócitos, onde ocorre a redução da comunicação pelas junções comunicantes e o aumento da atividade de hemicanais (SÁEZ *et al.*, 2013).

Com isto, foram detectados 11 tipos de conexinas no sistema nervoso central como mostra a Tabela 3 (FOWLER *et al.*, 2010; KAR *et al.*, 2012).

Tipos Celulares	Conexinas identificadas - Proteína ou RNAm							
Astrócitos	Cx26	Cx30	Cx40	Cx 43	Cx45			
Oligodendrocitos	Cx29	Cx32	Cx45	Cx47				
Neurônios	Cx26	Cx 32	Cx 36	Cx 37	Cx40	Cx 43	Cx45	Cx47
Precursors Neurais	Cx26	Cx33	Cx40	Cx 43				

Tabela 3: Conexinas em células Gliais e Neurônios do Sistema Nervoso. Fonte ROUACH *et al.* (2002).

No sistema auditivo é possível encontrar diversos tipos de conexinas diferentes e apesar de serem necessários mais estudos acredita-se que sua função neste sistema envolva a recirculação de K^+ (Figura 12) e a passagem de IP_3 (GOSSMAN e ZHAO, 2008), importantes para a atividade de células presentes no Órgão de Corti.

Dentro da cóclea, o estímulo hidro-mecânico do som resulta em movimentos ondulatórios da membrana basilar que suporta o órgão espiral e suas células ciliadas. O deslocamento da membrana basilar gera o desvio de um feixe de filamentos de actina localizados no ápice das células ciliadas (estereocílios). O deslocamento dos estereocílios em um ângulo menor que um grau, abre mecanicamente os canais de transdução, permitindo o influxo de íons de potássio da endolinfa para as células ciliadas externas, causando despolarização da membrana celular e o influxo de íons de cálcio, o que conduz a estimulação do nervo auditivo aferente e a formação de sinapses com a região basal das células ciliadas, convertendo o estímulo sonoro em estímulos elétricos que são transmitidos ao sistema nervoso auditivo central (FRIEDMAN *et al.*, 2000).

Foi relatada a presença de diferentes tipos de conexinas, incluindo as: Cx26, Cx30, Cx31, Cx32 e Cx43 expressas na cóclea e a presença da junção comunicante tanto na cóclea quanto no órgão de Corti (MARTINEZ *et al.*, 2009), de modo que mutações na Cx26, Cx30, Cx31, Cx32 e Cx43 contribuem para uma grande proporção de surdez causada na população humana (KELSELL *et al.*, 2001).

Em deficiências auditivas, o dano no papel das junções comunicantes interfere no processo de manutenção das altas concentrações de potássio intracelular, o que prejudica a resposta rápida das células ciliadas ao novo estímulo sonoro (KELSELL *et al.*, 1997, LAIRD e LAMPE, 2022).

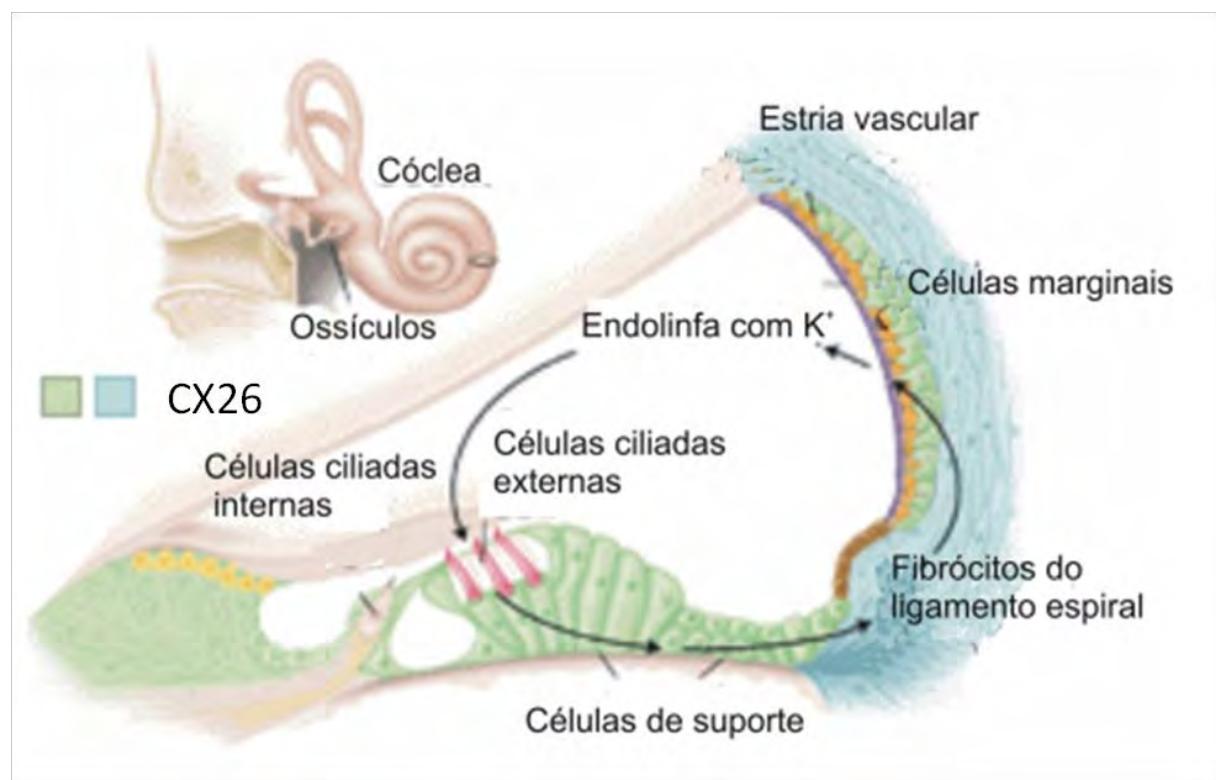


Figura 12: Representação do processo homeostático do íon K⁺ no interior da cóclea. Representação do processo homeostático do íon K⁺ no interior da cóclea, mostrando a expressão da Conexina 26 (verde e azul) nas células de suporte do Órgão de Corti, nos fibrócitos do Ligamento Espiral e nas células da Estria Vascular (STEEL, 1999).

No sistema excretor diversos estudos forneceram evidências da expressão de RNA mensageiro (mRNA) de 10 conexinas diferentes no rim, incluindo Cx26, Cx30, Cx30.1, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 e Cx46

tendo o último artigo revisional publicado em 2010 por Hanner e colaboradores como mostrado na Figura 13.

Sua função neste sistema envolve a regulação hemodinâmica renal, mecanismos de sinalização e participação na resposta vasomotora do sistema, de modo que as células da musculatura lisa presentes na arteríola aferente permitam contribuir para a comunicação dos néfrons vizinhos. Sendo expressos na vasculatura renal as Cx37, Cx40, Cx43 e Cx45, com predominância da Cx40 nas células endoteliais e Cx45 nas células musculares lisas vasculares (WAGNER, 2008).

Além disso, a deleção dos genes Cx40 e Cx43 resultam na alteração funcional das células produtoras de renina, sugerindo envolvimento dessas isoformas de conexinas na regulação da secreção e síntese de renina (HANNER *et al.*, 2010).

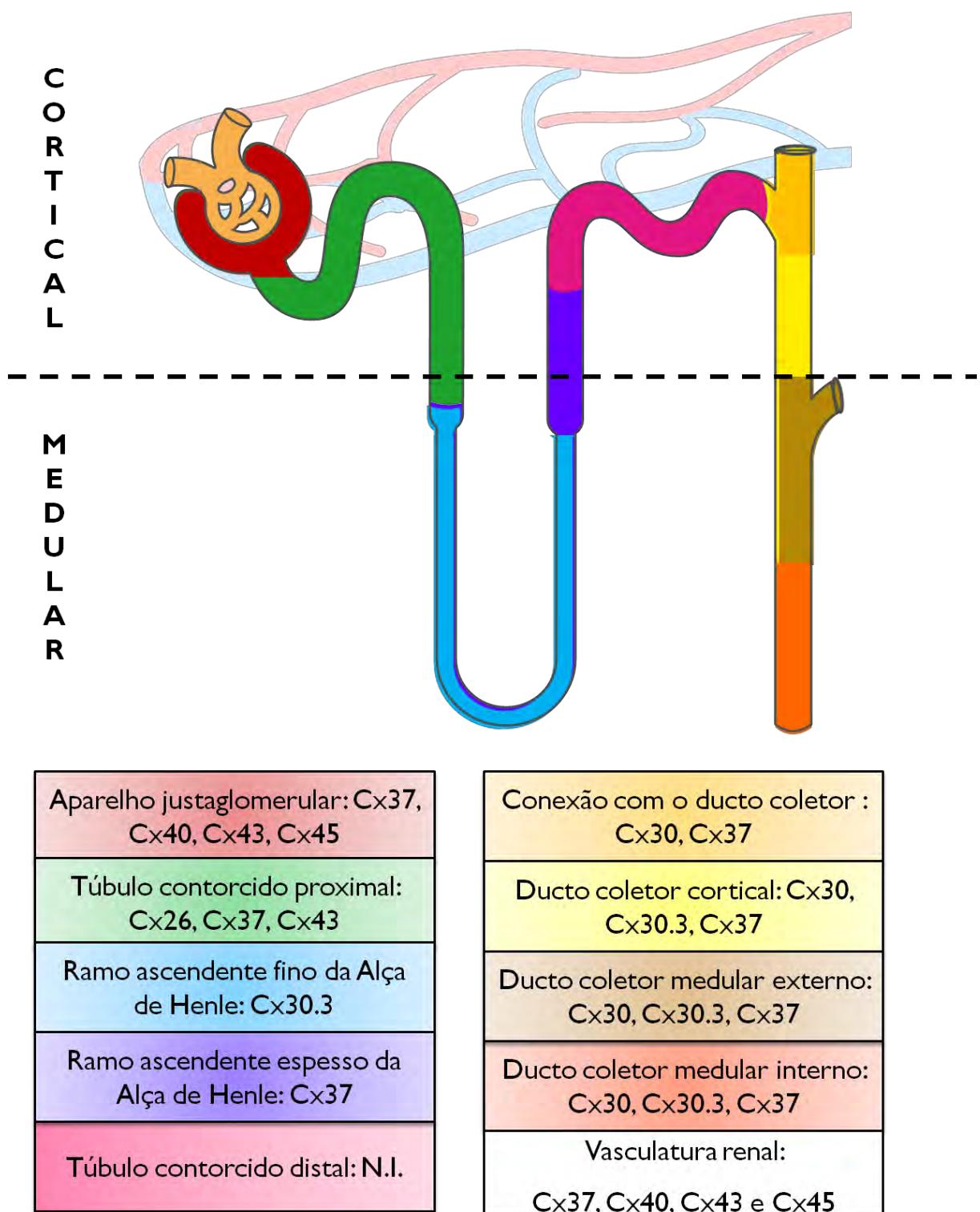


Figura 13: Desenho esquemático da localização dos tipos de conexina presentes no néfron. Conexinas encontradas nas porções que constituem um néfron (recriado de HANNER *et al.*, 2010)

Um dos primeiros órgãos em que essas junções foram detectadas foi o fígado, com predominância da Cx32 e Cx26. O papel da junção comunicante na regulação da função hepática foi revisado por Vinken *et al.* (2007), relatando que os hepatócitos comunicam-se diretamente entre si através das junções comunicantes, e estas também promovem a troca direta de mensageiros essenciais que por sua vez regulam aspectos-chave do ciclo de vida hepático, incluindo crescimento e proliferação celular, diferenciação, funcionamento celular e apoptose.

O estudo de Meda (1996) em ilhotas pancreáticas e células ácinares (células responsáveis pela liberação de enzimas digestivas e outros componentes não enzimáticos no duodeno) indicam que a comunicação celular pelas junções comunicantes é necessária para a biossíntese, armazenamento e liberação adequada de insulina e amilase, com isto, a Cx43 é expressa em ilhotas pancreáticas e as Cx26 e Cx32 nos ácinos pancreáticos, e essa expressão também é encontrada em várias outras glândulas endócrinas e exócrinas.

Há relatos que indicam que a comunicação via hemicanais, possa estar envolvida na regulação da indução de morte celular em condições patológicas (SAEZ *et al.*, 2003). Estudos testando a resposta celular à liberação de LPS (Lipopolissacarídeo, componente da parede celular de bactérias gram negativas), presente durante a infecção bacteriana, demonstraram que os hemicanais juncionais regulam a propagação da morte celular, por evitar a propagação de fatores apoptóticos para células vizinhas (VUYST *et al.*, 2007).

Em células migratórias a presença de junção comunicante foi descrita pela primeira vez em (Levy *et al.*, 1976), porém somente Fortes e Colaboradores (2004) indicaram em seus estudos que as junções eram funcionais nestas células eram funcionais. Tais estudos demonstraram que células da linhagem macrofágica J774-G8 e macrófagos peritoneais provenientes de camundongos suíços expressam junções comunicantes formadas pela proteína Cx43 e permitiam a passagem do corante de baixo peso molecular através do experimento de microinjeção de corante, caracterizando a presença deste tipo de comunicação em macrófagos.

Este estudo impulsionou diversos outros estudos que atualmente indicam que as funções da Cx43 em macrófagos são consideradas críticas em vários

processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo interações com células vizinhas no microambiente, migração para locais de inflamação, apresentação de抗ígenos, imunomodulação, bem como suporte a funções macrofisiológicas, como regulação dos batimentos cardíacos. A Cx43 também é modulada em doenças como HIV, sepse e outras, portanto, é provável que Cx43 também tenha importância em outros tipos de doenças (RODJAKOVIC, SALM e BELDI, 2021).

2.1.4 CONEXINA 43

Hansson e Skiölddebrand (2015) apresentaram diversas estruturas no corpo humano que possuem redes de células acopladas por junções comunicantes que expressam sistemas de sinalização para Cx43 e Ca^{2+} , relacionando inclusive as modificações destas redes com as patologias no organismo (Figura 14).

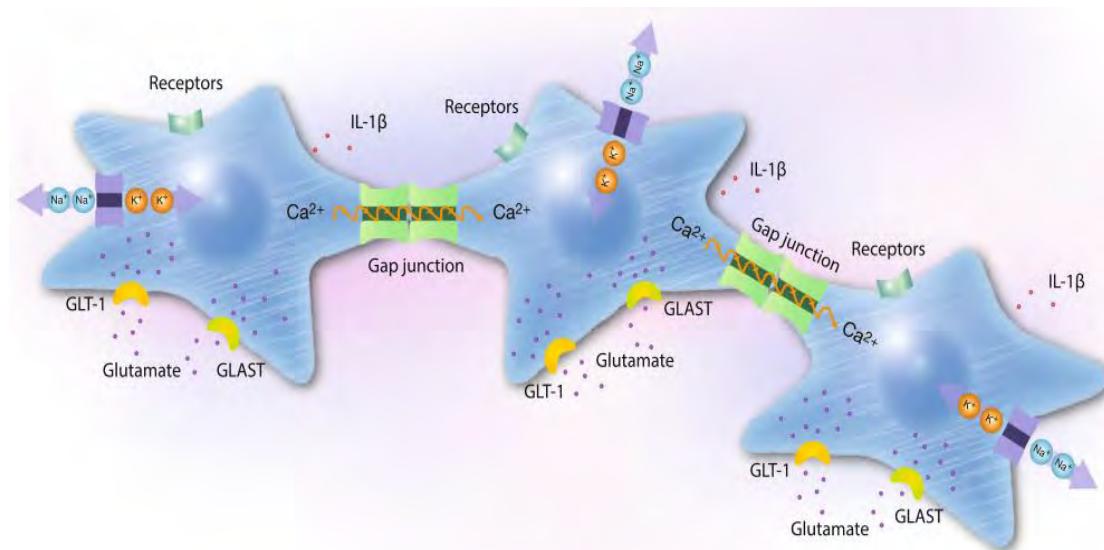


Figura 14: Ilustração esquemática de três células acopladas em rede e condições fisiológicas. As células são acopladas por junções comunicantes formando uma extensa rede celular. Receptores, bombas de íons, transportadores de glutamato, filamentos de actina (linhas brancas), liberação de citocinas e sinalização de Ca^{2+} são mostrados. O Ca^{2+} citosólico desempenha funções-chave como um segundo mensageiro e um sensor de Ca^{2+} celular detecta alterações no microambiente. Existem duas vias de comunicação: as principais vias de comunicação é a intercelular através das junções comunicantes compreendendo a Cx43, e através dos receptores na superfície das células que são acoplados às proteínas G que no processo de sinalização liberam Ca^{2+} do retículo endoplasmático via Fosfolipase C (PLC) e inositol trifosfato (IP3). As elevações de Ca^{2+} são seguidas pela propagação de ondas de Ca^{2+} intercelulares através das junções comunicantes, que também são permeáveis a moléculas de até 1 kDa, como Ca^{2+} , IP3 e cAMP (HANSSON e SKIÖLDEBRAND, 2015).

Os hemicanais formados pela Cx43 são altamente expressos em diversas células, como: microglia, astrócitos e endotélio, e são altamente sensíveis à (Padrões Moleculares Associados à Danos) DAMPs e (Padrões Moleculares Associados à Patógenos) PAMPs (CONTRERAS *et al.*, 2004; HANSSON e SKIÖLDEBRAND, 2015).

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

O domínio carboxi-terminal da Cx43 desempenha um papel no tráfego, localização e *turnover* dos canais por meio de numerosas modificações pós-traducionais e interações proteicas, se ligando a múltiplas proteínas que podem modular a função do canal, diversas técnicas foram usadas para identificar a interação entre estas proteínas durante todo o ciclo da conexina e Sorgen e colaboradores reuniram as estruturas que se relacionam em um artigo revisional publicado em 2018 (Tabela 4).

Proteína	Tipo de detecção	Proteína	Tipo de detecção
Actina	co-loc	Hrs	co-loc
AGS8	IP, co-Loc	HSP70	IP, PD
Proteína de ancoragem da quinase A 95	IP, co-Loc	HSP90	IP, co-Loc
Anquirina G	IP	Cadeia leve 3	IP, co-Loc
Fator indutor de apoptose	IP, co-Loc, PLA	Lin-7	PD
Atg16L / Atg14 / Atg9 / Vps34	IP, co-Loc	Miosina VI	co-loc
Bax	IP, co-Loc	DMPK	IP, co-Loc
β-arrestina	IP, co-Loc	Na V 1.5	co-loc
Subunidade β da proteína de transferência de elétrons	IP, co-Loc, PLA	N-caderina	co-loc
Fator de integração derivado do cérebro-1	IP, co-Loc	NOV / CCN3	IP, PD
CASK (LIN2)	IP, co-Loc	Ocludina	IP, co-Loc
Caveolina-1,2,3	IP, co-Loc	p120 ^{ctn}	co-loc
Clatrina	IP, co-Loc	P2X7	IP, co-Loc
Claudina 5	IP, co-Loc	P62	IP
CIP85	IP, co-Loc	PKG	IV
Consortina	IP, co-Loc	Placofilina-2	co-loc
Ciclina E	IP, PLA, TEM	PP1 / PP2A	IP, co-Loc
Desmocolina-2 ^a	PD	RPTPμ	IP
Dlg	co-loc	Smurf2	IP, co-Loc
Dinamina	IP, co-Loc	STAMBP (AMSH)	IP, co-Loc
EB1	IP	TOM20	IP, co-Loc
Eps15	IP, co-Loc	TRIM21	IP, co-Loc
ERp29	IP, co-Loc	USP8	IP
		Vinculina	IP, co-Loc
		Wwp1	IP
		ZO-2	IP, co-loc, PD, FW

Tabela 4: Sugestão de proteínas que interagem com a Cx43. Sugestão de proteínas que interagem com a conexina 43 durante o ciclo, destacando proteínas que participam do tráfego, localização e turnover. Legenda: IP: Imunoprecipitação, Co-Loc: Co-localização, PLA: Ensaio de ligação por proximidade, TEM: Microscopia eletrônica de transmissão, PD: Pull-down, IV: Ensaio in vitro (SORGEN *et al.*, 2018).

Com relação aos tecidos que apresentam a expressão de conexinas, pôde se observar a presença de Cx43 na medula óssea de recém-nascidos e de adultos, o que pode estar relacionado com a regulação da comunicação entre células hematopoiéticas e mesenquimais neste tecido (MORITA *et al.*, 2007).

Em astrócitos, a junção comunicante formada por Cx43 tem sido implicada na manutenção do meio extracelular dos neurônios (CHEW *et al.*, 2010). Já em células da micróglia, quando se encontra em homeostase existe uma morfologia ramificada com um baixo nível de Cx43 (GARG *et al.*, 2005), mas estímulos como lesões cerebrais ou infecções ativam as células da microglia que aumentam a expressão de Cx43 (EUGENIN *et al.*, 2001). Estas alterações na expressão de Cx43 podem ser relacionadas à presença de moléculas da cascata inflamatória. (WANG e PERACCHIA *et al.*, 1994).

Em alguns tipos celulares a Cx43 é expressa em abundância em condições basais, como em miócitos cardíacos (ROUACH *et al.*, 2002), músculo liso ou neurônios (SEVERS *et al.*, 2004).

A Cx43 em adipócitos está relacionada a diferenciação celular, sendo fundamental para a manutenção do pré-adipócito durante o processo de expansão clonal na adipogênese, assim como também está relacionado a via de sinalização na via de proliferação e diferenciação durante a osteogênese, atuando em osteócitos. Quando o processo de diferenciação se inicia ocorre o aumento da expressão desta junção celular (ROJAS-GOMEZ, 2016).

Laird publicou um artigo em 2006 que aponta todos os tecidos e células onde foi identificada a presença da Conexina 43, sendo a Tabela 5 um bom resumo dos locais de identificação.

Tecido	Tipo celular	Tecido	Tipo celular
Cardíaco	Cardiomiócitos	Testículos	Células de Sertoli
	Células de músculo liso		Células de Leydig
Cavidade oral	Queratinócitos	Ovário	Células da Granulosa
Polpa dentária	Odontoblastos	Útero	Células miometrais
	Células pulparas	Oviduto	Células epiteliais
	Fibroblastos periodontais		Células de músculo liso
Glândulas salivares	Células mioepiteliais	Glândula mamária	Células epiteliais
Esôfago	Células epiteliais	Pulmão	Células epiteliais alveolares
Estômago	Células epiteliais	Traquéia	Células de músculo liso
Gastroduodenal	Células musculares	Osso	Osteoblastos
Intestino delgado	Células musculares		Osteoclastos
	Células de Cajal		Osteócitos
Colón uterino	Células musculares	Cartilagem	Condrocitos
Pâncreas	Células-β endócrinas	Rim	Células vasculares, Células glomerulares
			Células intersticiais suburoteliais
Hipófise	Células da hipófise anterior e posterior	Bexiga	Células de músculo liso
Glândula paratireóide	—		Células intersticiais suburoteliais
Glândula tireóide	Células epiteliais da tireóide	Retina	Células gliais retinais
Glândula adrenal	—	Timo	Células epiteliais do timo
Pele	Queratinócitos	Medula óssea	Células estromais
	Fibroblastos dérmicos	Linfonodo	Células dendríticas foliculares
Músculo (miogênese)	Mioblastos	Baço	Células dendríticas foliculares
Cérebro	Astrócitos	Tonsila	Células epiteliais tonsilares
	Células leptomeníngicas		
	Células ependimárias		

Tabela 5: Principais tecidos e tipos células com Cx43 (LAIRD, 2006).

As junções comunicantes também executam um papel de destaque em estudos associados às infecções parasitárias (DE CARVALHO *et al.*, 1998). Estudos que envolvem a interação de macrófagos com *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma Cruzi* demonstraram que o parasita possui a capacidade de reduzir o acoplamento e a expressão de conexina entre astrócitos e células da leptomeninge, levando a crer que esta pode ser uma resposta celular geral à infecção com protozoários intracelulares (DE CARVALHO *et al.*, 1998).

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

A Cx43 também foi detectada dentro das mitocôndrias, sendo a conexina mitocondrial mais bem estudada até o momento (BOENGLER *et al.*, 2022).

2.2 TOXOPLASMOSE

Toxoplasma gondii é o protozoário causador da toxoplasmose, de caráter intracelular obrigatório capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de mamíferos, aves e répteis, incluindo o homem (DUBEY; LINDSAY e SPEER, 1998; ATTIAS *et al.*, 2020). Sua capacidade de induzir infecções duradouras em animais de sangue frio tem como fonte mais provável de infecção o consumo de carne contendo cistos teciduais ou pela ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos (FERREIRA *et al.*, 2020).

Este parasita pertencente ao Filo Apicomplexa, à Classe Sporozoea, à Sub-classe Coccidia, à Ordem Eucoccidiida, à Família Sarcocystidae e à Sub-família Toxoplasmatinae (LEVINE *et al.*, 1980; DUBEY e HILL, 2002.). O gênero *Toxoplasma* contém apenas uma espécie, denominada *T. gondii*, que pode ser agrupada em genótipos (tipos I, II e III, XII e os haplótipos X e A) e alguns são restritos a animais selvagens (ATTIAS *et al.*, 2020).

O presente protozoário é um patógeno com um processo de infecção bem sucedido, na qual em algumas populações foi estimada a proporção de infecção de 60%, o que indica de forma global uma porcentagem de infecção que chega a cerca de 30% da população mundial (HIDE, 2016; CDC, 2018).

Dubey e colaboradores (2012) demonstraram que no Brasil 1 (uma) a cada 1.000 (mil) crianças nascidas estavam infectadas com o *T. gondii*, o que representaria anualmente um total de 2.649 crianças susceptíveis a nascerem com toxoplasmose congênita. A maioria das crianças infectadas podem desenvolver sinais clínicos da toxoplasmose, como doenças neurológicas, incluindo hidrocefalia, microcefalia, deficiência intelectual e lesões oculares (probabilidade de 80%), além da possibilidade de virem ao óbito logo após o nascimento.

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

As fontes de *T. gondii* isoladas e genotipadas no Brasil são identificadas no mapa abaixo (Figura 15), demonstrando a quantidade de casos nos estados em que a doença foi relatada (valores apresentados em milhões de pessoas).

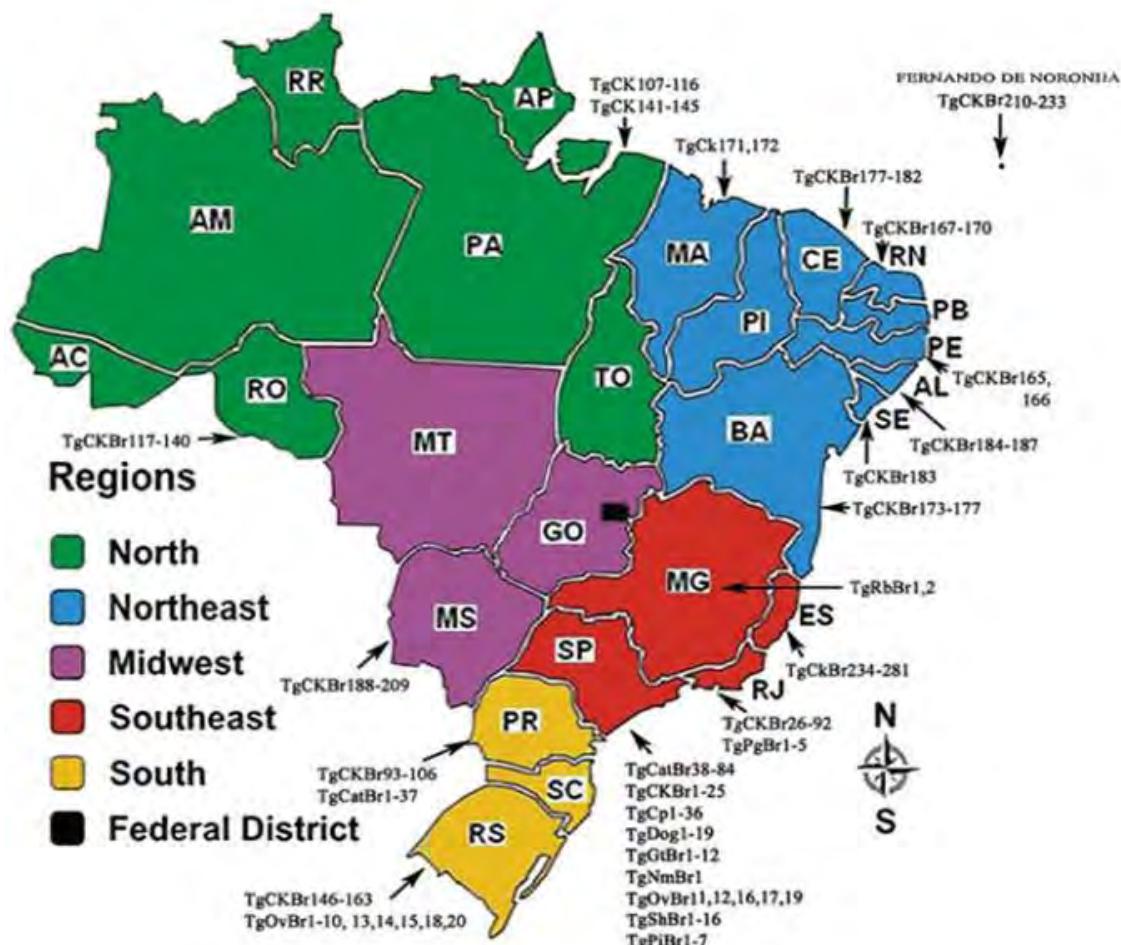


Figura 15: Mapa do Brasil com 5 regiões e distribuição da população humana, demonstrando fontes de *T. gondii* isolados genotipados. Para a construção da imagem foram consultados artigos originais Sorológicos, parasitológicos, informação clínica e genética histórica detalhada sobre as infecções do *T. gondii* em humanos e outros animais. Abreviação dos estados — (população em milhões, %): AC – Acre (0,7; 0,38%), AL – Alagoas (3,1; 1,64%), AM – Amazonas (3,4; 1,83%), AP – Amapá (0,6; 0,35%), BA – Bahia (14,0; 7,35%), CE – Ceará (8,4; 443%), DF – Distrito Federal (2,5; 1,35%), ES – Espírito Santo (3,5; 1,84%), GO – Goiás (6,0; 3,15%), MA – Maranhão (6,5; 3,45%) MS – Mato Grosso do Sul (2,4; 1,28%) MG – Minas Gerais (19,5; 10,27%), MT – Mato Grosso (3,0; 1,59%) PA – Pará (7,5; 3,97%), PB – Paraíba (3,7; 1,97%), PE – Pernambuco (8,7; 4,61%), PI – Piauí (3,1; 1,63%), PR – Paraná (10,4; 5,48%), RN – Rio Grande do Norte (3,2; 1,66%), RJ – Rio de Janeiro (15,9; 8,38%), RO – Rondônia (1,5; 0,82%), RR – Roraima (0,4; 0,24%), RS – Rio Grande do Sul (10,6; 5,60%), SC – Santa Catarina (6,2; 3,28%) SE – Sergipe (2,0; 1,08%) SP – São Paulo (41,2; 21,63%) TO – Tocantins (1,3; 0,73%). (Dubey et al; 2012)

Toxoplasma gondii foi descrito pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux em um roedor encontrado na Tunísia, Norte da África. Como apontado por De Souza et al. (2010), no Brasil o Toxoplasma foi relatado pela primeira vez por Splendore em 1908, encontrado em um coelho. O nome da espécie é originário do roedor *Ctenodactylus gundi*, do qual foi isolado; e o

gênero é derivado do grego toxon (arco) e plasma (molde) devido ao seu formato encurvado e crescente (FERGUSON, 2009).

Em 1937 foi sugerido pela primeira vez que existe uma forma de disseminação natural do *T. gondii* por meio da ingestão de tecido contaminado com toxoplasma (SABIN e OLITSKY, 1937). E em 1940 Pinkerton e Weinman relataram um caso fatal de toxoplasmose em um adulto.

No ano seguinte Wolf, Cowen e Paige, (1941) relataram pela primeira vez a transmissão congênita em uma análise de casos de mães assintomáticas, mas com recém-nascidos com encefalite testados positivos para o protozoário.

Em 1948 foram desenvolvidos métodos sorológicos com anticorpos específicos para o *T. gondii* por Sabin-Feldman (1948), o que permitiu realizar estudos em larga escala para identificar indivíduos (humanos e animais) infectados com o parasita.

Através desta descoberta foi possível identificar que o parasita tem a capacidade de infectar qualquer animal de sangue quente, o que permitiu associar as diferentes formas clínicas da doença ao *T. gondii* (DUBEY, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2008).

Em 1960 foi confirmado o possível papel da ingestão do cisto na transmissão do parasita, após a demonstração de que os bradizoítos em cistos teciduais podem sobreviver à exposição ao ácido clorídrico e tripsina (JACOBS, REMINGTON, e MELTON, 1960). Tais achados embasaram as indicações de que a ingestão de carne mal cozida ou crua também contribuía para transmissão do Toxoplasma em humanos, o que fora confirmado por Desmonts *et al.* (1965).

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

2.2.1 CICLO DE VIDA DO *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* infecta animais considerados hospedeiros intermediários que incluem mamíferos terrestres, aquáticos e aves, ocorrendo neles apenas estágios assexuados do ciclo. As fases sexuadas são observadas nos membros da família Felidae, incluindo o gato doméstico (ATTIAS *et al.*, 2020)

Deste modo, o *T. gondii* possui um ciclo heteroxeno, tendo como hospedeiro definitivo o felino, marcado pela presença dos oocistos que figuram o estágio ambientalmente resistente do parasita. Este é o hospedeiro mais importante, do ponto de vista epidemiológico, para a toxoplasmose humana, dada a sua convivência próxima com o homem (HILL e DUBEY, 2016).

De acordo com Dubey *et al.* (1998) existem três estágios infecciosos do *T. gondii* em seu ciclo de vida: (1) forma Esporozoíta (nos oocistos); (2) forma Bradizoíta (nos cistos teciduais); e (3) forma Taquizoíta (replicação assexuada), como mostrado na Figura 16.

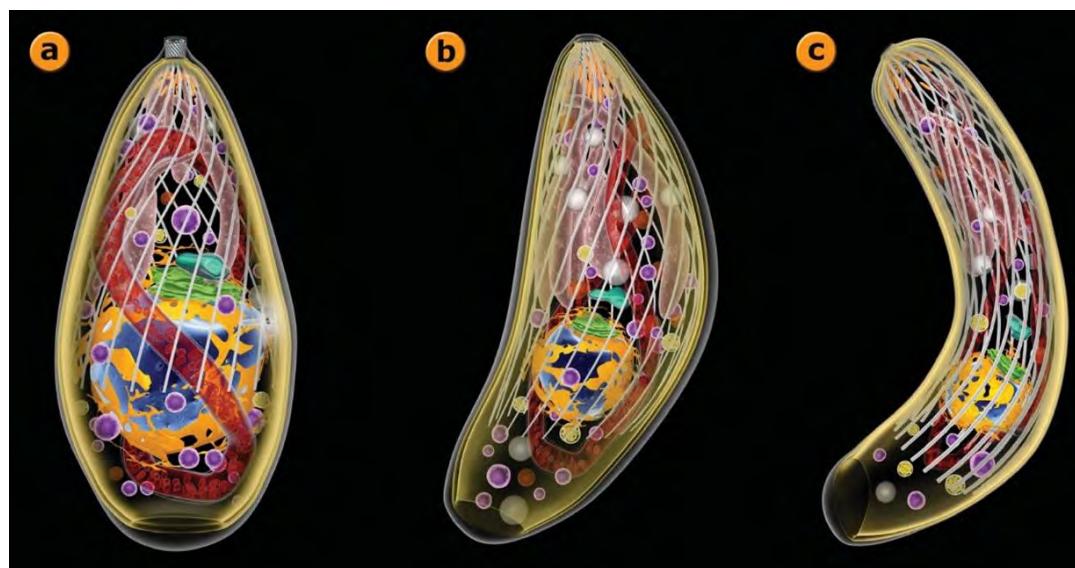


Figura 16: Os três estágios infecciosos do *T. gondii*. Taquizoíta (**a**), bradizoíta (**b**) e esporozoíta (**c**). O núcleo (azul) é circundado pelo retículo endoplasmático rugoso (amarelo). Acima dele, o complexo de Golgi (verde) e o apicoplasto (azul esverdeado). A única mitocôndria se espalha pelo citosol (vermelho). Grânulos densos (magenta) e grânulos de amilopectina (brancos) estão dispersos no citosol. O complexo apical é composto pelo conóide cilíndrico. Abaixo, as organelas secretoras: micronemas (laranja) e roptrias (rosa). O corpo celular é limitado por três unidades de membrana (a película) e abaixo dela um conjunto de microtúbulos subpeliculares (ATTIAS *et al.*, 2020).

O ciclo assexuado consiste em dois estágios de vida distintos dependendo da fase da infecção: aguda ou crônica. (DE SOUSA *et al.*, 2010)

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

De acordo com Elmore *et al.* (2010), é estimada a soro prevalência em gatos domésticos (*Felis catus*) que pode chegar à 30-40% em um todo. Na maioria das vezes esse ciclo tem início com a ingestão de cistos teciduais através do carnivorismo ou na ingestão de oocistos esporulados (SHAPIRO *et al.* 2019).

Os hospedeiros intermediários podem ser infectados por diversas vias, incluindo: (1) ingestão de água, vegetais e frutas contaminadas com oocistos viáveis, esporulados após eliminação prévia nas fezes de gatos; (2) ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais viáveis; (3) transmissão congênita através da placenta; (4) ingestão de frutos do mar mal cozidos; (5) transfusão de sangue; (6) transplante de órgãos. Além destas possibilidades anteriores de infecção, também é identificada na ingestão de leite ou de produtos lácteos não pasteurizados uma potencial fonte de transmissão (BAHIA-OLIVEIRA *et al.* 2003; SHAPIRO *et al.* 2019; ATTIAS *et al.*, 2020).

A partir desta infecção, o parasita irá apresentar duas formas de diferenciação de acordo com a fase da infecção, e se multiplicam assexuadamente (Figura 3).

Como foi descrito por Dubey *et al.* (1998), no ambiente externo estes oocistos esporulam, se tornando infecciosos e possuindo em seu interior esporocistos, que contém a forma infectante esporozoíta.

Esta é a principal via de transmissão, e garante que os oocistos sejam distribuídos no meio ambiente pela dispersão deste material durante a chuva, vento ou pela fauna coprófila. O número de oocistos eliminados na evacuação de um gato contaminado é da ordem de 20 à 20 milhões em 20 gramas de fezes (SHAPIRO *et al.* 2019).

Após a ingestão de cistos presentes nos tecidos de um hospedeiro intermediário, a parede do cisto é destruída por enzimas gástricas e os bradizoítos se estabelecem dentro dos enterócitos, onde sofrem um número autolimitado de multiplicações assexuadas, caracterizadas pelo desenvolvimento de merozoítos dentro dos esquizontes (DUBEY *et al.*, 1970; DUBEY, 1998).

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

Após a fertilização, os oocistos formados dentro dos enterócitos são liberados pela lise celular e excretados como formas não esporuladas nas fezes dos gatos. O processo de esporogonia ocorre após alguns dias no ambiente externo. Este processo é uma redução meiótica e mudanças morfológicas que levam à formação de um oocisto esporulado com dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos haplóides. A eliminação dos oocistos começa de 3 a 7 dias após a ingestão dos cistos teciduais e pode continuar por até 20 dias (DUBEY e FRENKEL, 1972; JONES e DUBEY, 2010).

Após o início do desenvolvimento de numerosas gerações de *T. gondii*, cinco tipos morfológicamente diferentes do parasita se desenvolvem em células epiteliais do intestino antes da gametogonia começar. Estes estágios se estendem dos tipos de A até E, como demonstrado na figura 17 (DUBEY e FRENKEL, 1976; DUBEY et al., 1970, DUBEY et al., 1998, HILL e DUBEY, 2002).

Esta primeira etapa é seguida pelo desenvolvimento sexual, com a formação dos gametas masculino e feminino (gametogonia) (FERGUNSON, 2002).

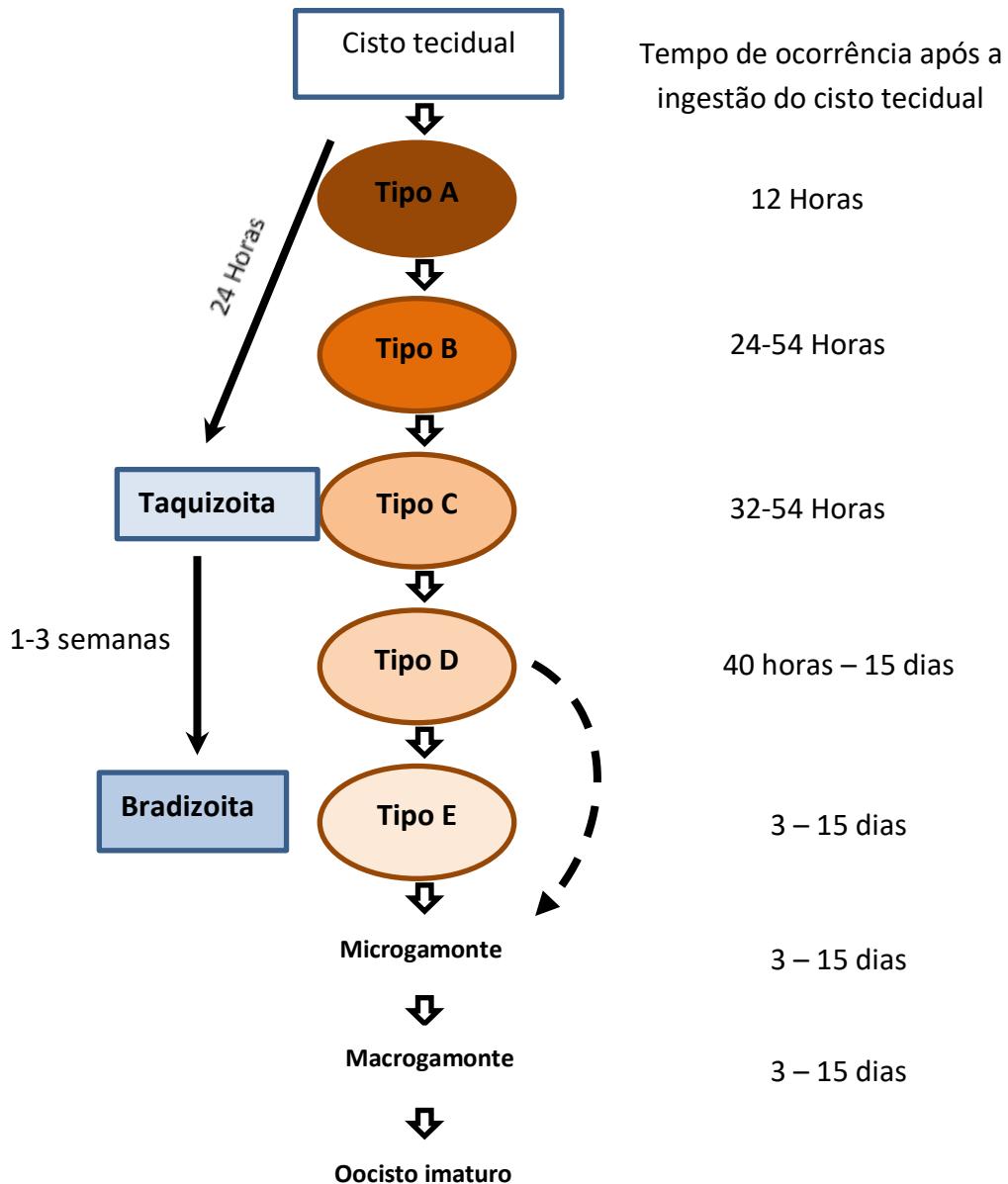


Figura 17: Esquema do ciclo sexual do *T. gondii* iniciado com a ingestão do cisto que terá a membrana rompida. No estágio de Enteroepitelial, os bradizoítas passaram pelos estágios de diferenciação A, B, C, D e E, com o decorrer do tempo, dando origem ao microgametócito que irá originar os oocitos imaturos. (Modificado de Dubey *et al.*, 1998)

Nos hospedeiros intermediários (Figura 18), o parasita sofre desenvolvimento assexuado. Após a ingestão, os bradizoítas ou esporozoítas se diferenciam rapidamente em taquizoítas, estes se disseminam dentro do hospedeiro e levam à fase aguda da infecção (FERREIRA DA SILVA *et al.*, 2008)

A forma taquizoíta possui como característica básica a rápida multiplicação, sendo esta forma também a responsável pela transmissão vertical para o feto via placenta (DUNCANSON *et al.*, 2001).

Sob ação do sistema imunológico do hospedeiro, como método de evasão, os taquizoítas diferenciam-se em bradizoítas, que formam os cistos teciduais ou tissulares, dando início à fase crônica da infecção tendo como característica diferencial o metabolismo lento podendo permanecer por muito tempo no tecido (DUBEY *et al.*, 1998).

Segundo De Sousa *et al.* (2010) estes cistos são encontrados na fase crônica do ciclo e predominam no sistema nervoso central e nos tecidos musculares esquelético e cardíaco, onde podem permanecer pelo resto da vida do hospedeiro sem causar resposta inflamatória.

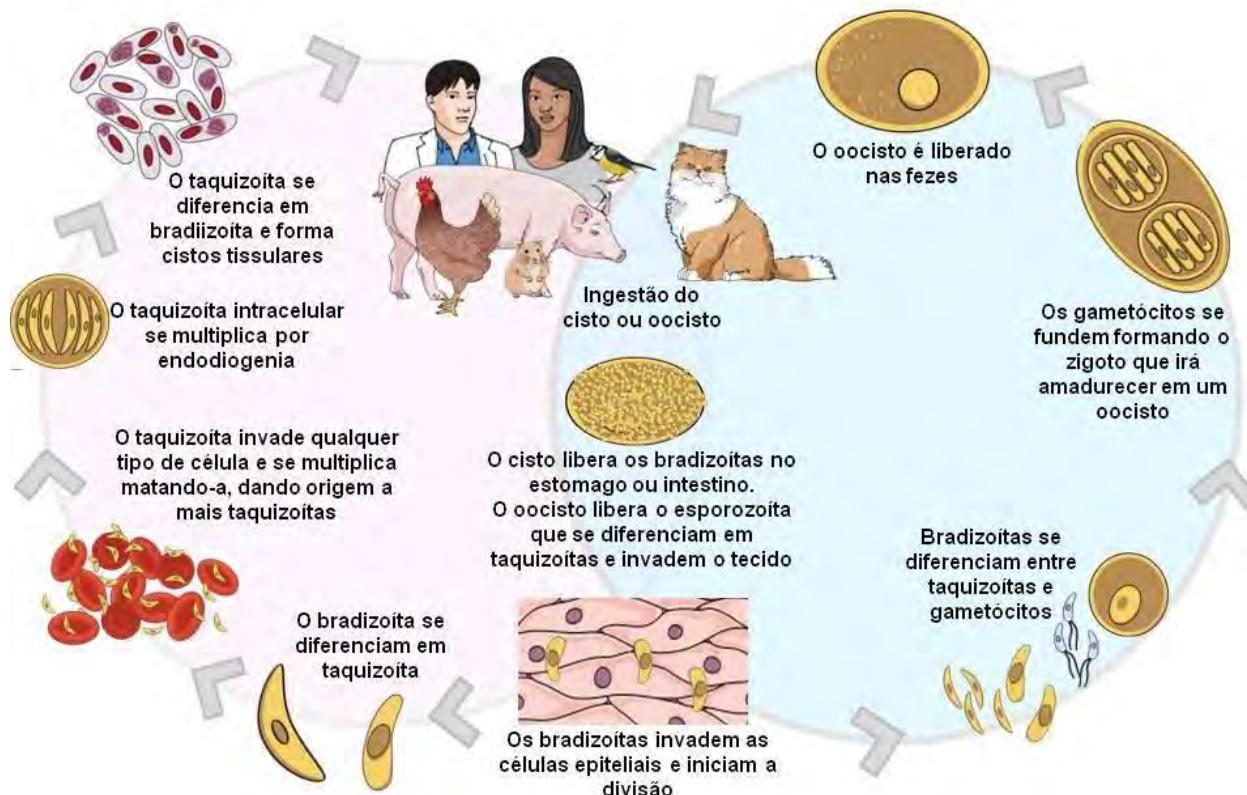


Figura 18: Figura 4: Organização esquemática descrevendo o ciclo de vida do *T. gondii*. (Acervo LTFCM)

2.2.2 ASPECTOS CELULARES

O *T. gondii* possui uma variedade de organelas especializadas que liberam proteínas ligadas a motilidade e a invasão celular, modulando as vias do hospedeiro (LOURIDO, 2019).

As três formas infecciosas apresentam a mesma organização primária, exibindo uma forma alongada e um complexo apical (ATTIAS *et al.*, 2020). O filo Apicomplexa é caracterizado pela presença do complexo apical, composto de organelas secretórias especializadas, como róprias e micronemas, e de elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e o conóide, este último apenas nos coccídeos, subclasse que inclui *T. gondii*. (DE SOUZA *et al.*, 2010)

As estruturas estão assinaladas na microscopia de transmissão mostrada na figura 19.

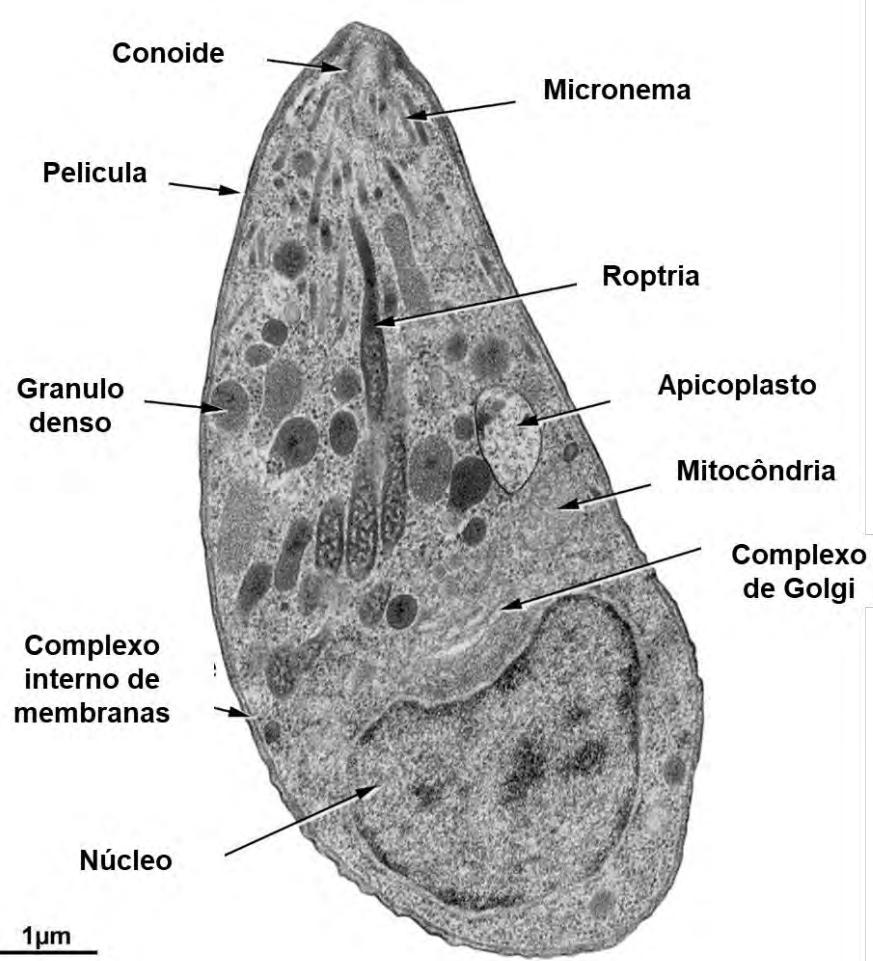


Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão de um taquizoíta de *T. gondii*. (ATTIAS *et al.*, 2020)

Um complexo de membranas denominado como película delimita todo o corpo do protozoário. É formado por uma membrana plasmática externa e,

abaixo dela, duas membranas estreitamente opostas que formam o complexo de membranas internas. Este complexo interno está ausente na região mais apical onde o conóide está localizado e na parte posterior da célula (ATTIAS *et al.*, 2020).

Uma das características do citoesqueleto do *T. gondii* é o conóide, ele aparece como um cilindro oco inserido dentro do anel polar do qual emergem os 22 microtúbulos subpeliculares. Tem um diâmetro de 400 nm e um comprimento de 250 nm e está presente em dois estados. Em estado de repouso, aparece sob o anel polar. Durante o processo de invasão da célula hospedeira ele é ativado por um influxo de Ca ⁺⁺ e desloca-se em direção à região anterior das células (MONTEIRO *et al.*, 2001, MONDRAGON *et al.*, 1996).

No estado de repouso, o conóide se posiciona abaixo da membrana plasmática, sob o anel posterior, de onde emergem os microtúbulos subpeliculares. Dois microtúbulos estão situados no interior do conóide, e mais dois anéis apicais estão presentes em sua porção mais apical. O anel anterior tem um diâmetro de 160 nm e o segundo mede 200 nm (HU *et al.*, 2006; GRAINDORGE *et al.*, 2016).

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

O açúcar é desdobrado em ácido lático, ácido acético e outros produtos. O oxigênio consumido produz CO₂, tendo um sistema citocromo que oxida o NADH. A respiração é cianeto-sensível. Em toxoplasmas livres e intracelulares, foram encontradas reservas que parecem ser de glicogênio, sob a forma de pequenos grânulos, mais volumosos nos parasitos contidos em cistos. (REY, 2008)

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

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

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

Há três tipos de estágios infecciosos do *T.gondii*: (1) Taquizoítas (“tachos” = rápido em Grego), em grupos de clones; (2) Bradizoítas (“brady” = devagar em Grego), em cistos teciduais; e (3) Esporozoítas, em oocistos (MERCIER *et al.*, 2002).

O *T. gondii* também possui como característica a presença de organelas secretoras apicais, sendo os micronemas as organelas mais abundantes, estas são encontradas em maior número em esporozoítas, taquizoítas e bradizoítas respectivamente (DUBEY; LINDSAY e SPEER, 1998). Estes micronemas se concentram em torno do anel polar abaixo do sistema de membrana e parecem se fundir com a região onde existe apenas a membrana plasmática (PAREDES-SANTOS, DE SOUZA e ATTIAS, 2012).

O conteúdo protéico secretado pelos micronemas é essencial para a movimentação do protozoário e sua associação com a membrana da célula hospedeira (CARRUTHERS e SIBLEY, 1997). As proteínas micronemais incluem proteínas com propriedades semelhantes às perforinas, adesinas e proteases que participam do processo de infecção a célula hospedeira (SOLDATI, DUBREMETZ E LEBRUN, 2001; KAFSACK e CARRUTHERS, 2010).

As roptrias são maiores que os micronemas, têm duas regiões bem definidas. Esta estrutura contem proteínas envolvidas no fator de virulência levando a subversão das funções da célula hospedeira e concentra proteínas associadas à invasão celular apresentando um pH ácido, além desempenhar um papel essencial na formação da membrana do vacúolo parasitóforo (PV) (BRADLEY e SIBLEY, 2007; BOOTHROYD e DUBREMETZ, 2008).

2.2.3 O TAQUIZOÍTA

Durante a infecção no hospedeiro intermediário, o *T. gondii* passa do estágio de taquizoíta de divisão rápida, responsável pela fase aguda, para o estágio de bradizoíta encistado, com a característica de replicação lenta (LYONS, MCLEOD e ROBERTS, 2002).

De acordo com Boothroyd e Black (2000), o taquizoíta de *T. gondii* é uma célula de forma alongada e polarizada, apresentando a região anterior afunilada e a região posterior arredondada com aproximadamente 5 μm de comprimento e 2 μm de largura.

Imagens de microscopia permitiram a descrição das estruturas celulares do taquizoíta de *T. gondii*. De acordo com De Souza *et al.* (2010) o núcleo celular situa-se na região mediana e acima deste dispõem-se o complexo de Golgi e o apicoplasto. Compondo o envoltório nuclear e ramificando-se pelo citosol, estão presentes elementos do retículo endoplasmático. A mitocôndria é única e ramificada. Os grânulos densos, acidocalcissomas e grânulos de amilopectina estão presentes em número e localização variáveis (Figura 20).

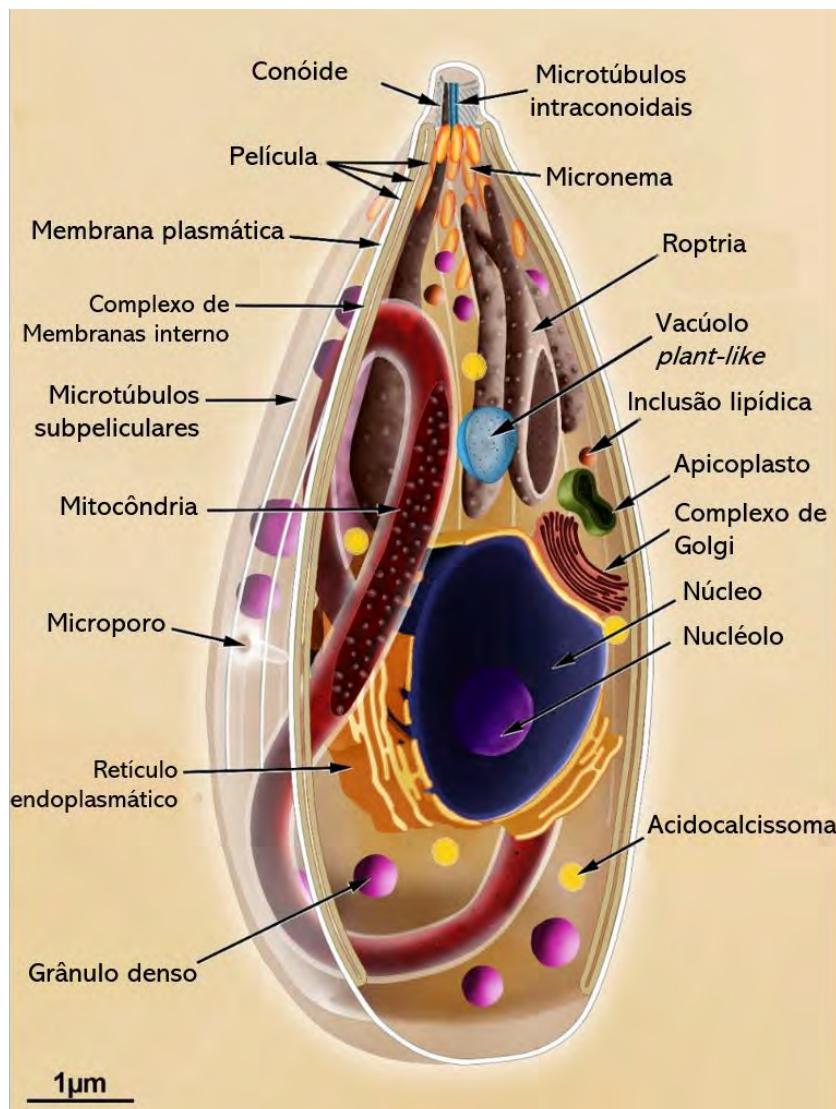


Figura 20: Desenhos esquemáticos em corte transversal de um taquizoíta de *T. gondii* indicando as principais estruturas e organelas (ATTIAS *et al.*, 2020)

O taquizoíta consegue se deslocar por deslizamento, flexão ondulante e com movimentos rotatórios, não possuindo meios visíveis de locomoção como cílios, flagelos ou pseudópodes (DUBEY *et al.*, 1998).

O *T. gondii* se locomove através da associação da película com os elementos do citoesqueleto. A película, estrutura trimembranar que envolve o taquizoíta, é formada pela membrana plasmática e pelo complexo membranar interno (DE SOUZA *et al.*, 2010).

As proteínas micronemas são as primeiras a serem secretadas e são essenciais para a motilidade do protozoário por deslizamento e adesão inicial à superfície da célula hospedeira. A motilidade deslizante resulta de um complexo conjunto de proteínas ancoradas a um motor de actina-miosina, localizado entre a membrana plasmática e a película interna. Este é chamado glideossomo, e envolve proteínas micronemas (AMA1 e MIC2) inseridas na membrana plasmática do taquizoíta que reconhecem e se ligam à receptores da membrana plasmática da célula hospedeira (ATTIAS *et al.*, 2020).

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

Para a invasão celular, o taquizoíta forma uma junção móvel com a membrana plasmática da célula hospedeira. Essa junção móvel forma um anel ao redor do taquizoíta no ponto de entrada na célula hospedeira (ATTIAS *et al.*, 2020).

Depois de penetrar na célula hospedeira, o taquizoíta torna-se oval e está rodeado pelo vacúolo parasitóforo (DUBEY *et al.*, 1998; PORTES *et al.*, 2023). As róprias, após a invasão, secretam seus conteúdos na célula hospedeira através de vesículas que irão se fundir com a membrana do vacúolo. Esse vacúolo tem características não fusogênicas, evitando a fusão com os elementos da célula hospedeira e escapando, assim, de uma fusão com os lisossomas (DE SOUZA *et al.*, 2010).

As proteínas secretadas pela porção basal da troparia também são responsáveis por implementarem modificações no comportamento da célula hospedeira, onde o protozoário sobreviverá e se multiplicará, além de provocar alterações no citosol da célula hospedeira, levando à alterações na distribuição de outras organelas desta célula, incluindo as mitocôndrias e o retículo endoplasmático (ATTIAS *et al.*, 2020).

Dubey *et al.* (1998) relatou que o taquizoíta multiplica-se assexuadamente no interior da célula hospedeira por endodiogenias repetidas, uma forma especializada de reprodução em que são formadas duas células filhas do parasita original (Figura 21).

O complexo de Golgi e o apicoplasto são as primeiras organelas a se dividirem, seguidos da divisão do centrossomo na porção posterior ao núcleo e do complexo de Golgi, em que o núcleo assume a forma de ferradura. Em seguida, ocorre o aparecimento de dois novos complexos apicais rudimentares, consistindo de conóide, anéis apicais e anel polar posterior, que irão nuclear os microtúbulos subpeliculares e o complexo interno de membrana. (DE SOUSA *et al.*, 2010; ATTIAS *et al.*, 2020).

Essas estruturas membranares começam a definir as células filhas dentro do citoplasma da célula mãe. A mitocôndria é a última organela a ser separada entre as células-filhas. As duas células-filhas emergem e a membrana externa da célula-mãe é incorporada. O complexo apical da célula-mãe desaparece. As duas células-filhas permanecem ligadas ao corpo residual onde os acidocalcissomas começam a se acumular. Este processo é repetido até que uma roseta de parasitas seja formada (DE SOUSA *et al.*, 2010; ATTIAS *et al.*, 2020).

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

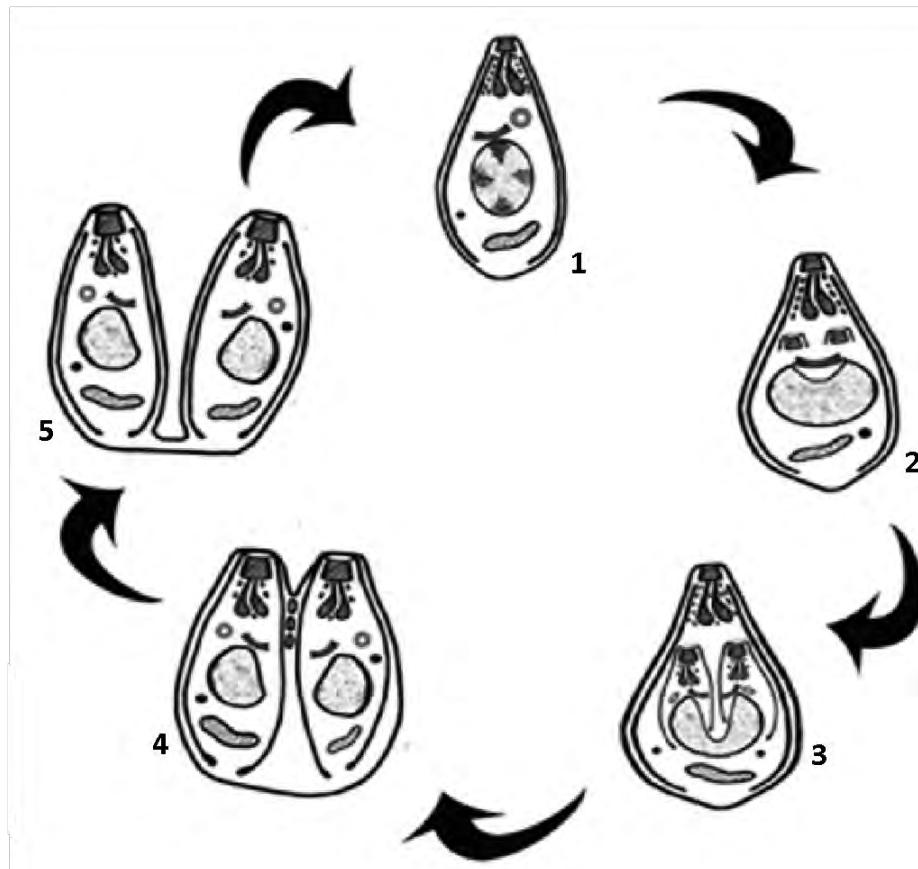


Figura 21: Diagrama simplificado do processo de divisão do *T. gondii* por endodiogéia. No início da divisão (1), dois complexos apicais começam a se desenvolver no meio da célula lembrando um conóide rudimentar e um centro organizador de microtúbulos. O núcleo assume formato de foice (2). À medida que o complexo interno se estende a partir destas estruturas, o núcleo, apicoplasto e a mitocôndria dividem-se entre as duas células filhas em formação (3). Ao término, as células filhas brotam e são envoltas pela membrana plasmática da célula mãe até a cisão completa (4). As células podem permanecer unidas por um corpo residual (5) ou separar-se dando início ao novo ciclo. Imagem modificada de De Sousa et al., (2010).

Os parasitas resultantes das divisões celulares organizam-se na forma de rosetas dentro do vacúolo parasitóforo e, após sucessivas multiplicações, atravessam ativamente a membrana do vacúolo e da célula hospedeira, que acaba por romper-se, liberando novos taquizoítas capazes de infectar outras células (DE SOUSA et al., 2010; PORTES et al., 2023).

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

Alguns dias após a infecção, os taquizoítas localizados dentro de um vacúolo parasitóforo gradualmente começam a alterar seu metabolismo, diminuindo a taxa de divisão e convertendo-se em bradizoítos (ATTIAS et al., 2020).

2.2.4 O BRADIZOÍTA

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

O tamanho de cada cisto varia de acordo com a idade, linhagem do parasita e natureza da célula hospedeira. Cistos pequenos têm diâmetro em torno de 5 μm , enquanto cistos antigos podem chegar a 60 μm , podendo conter cerca de 2.000 bradizoítos (ATTIAS *et al.*, 2020).

Os bradizoítas se diferem estruturalmente de taquizoítas, apresentando um núcleo situado em direção à extremidade posterior, enquanto o núcleo dos taquizoítas é mais central. Eles são mais delgados do que os taquizoítas e são menos suscetíveis à destruição por enzimas proteolíticas (Figura 22) (DUBEY *et al.*, 1998).

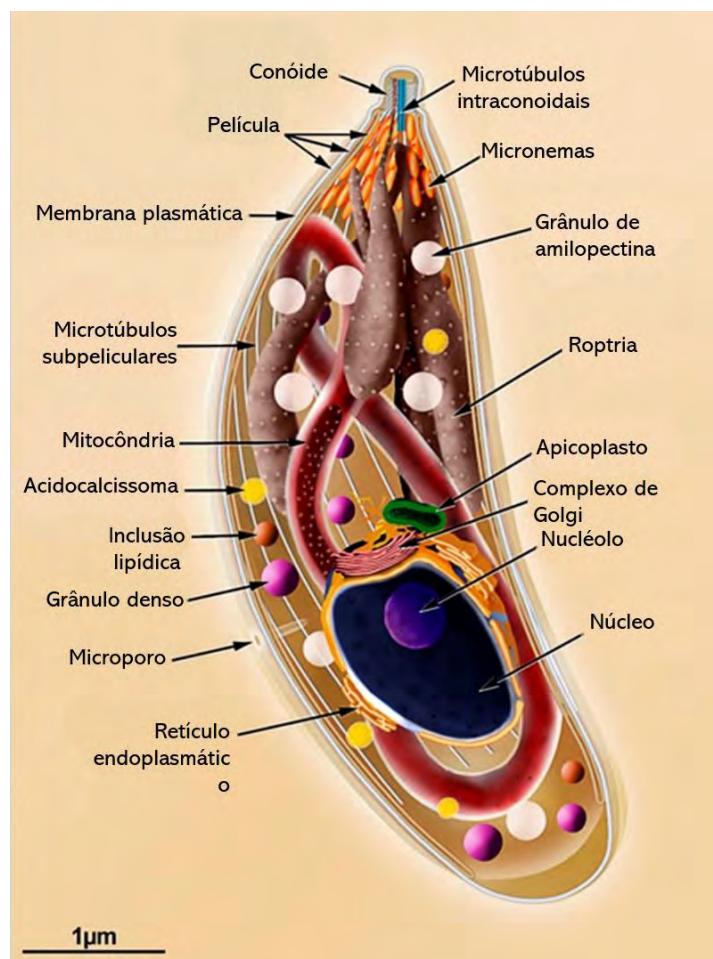


Figura 22: Desenhos esquemáticos de um bradizoíta de *T. gondii* em vista longitudinal. O maior número de micronemas e a presença de grânulos de amilopectina são as principais diferenças desta forma em relação aos taquizoítas. (ATTIAS *et al.*, 2020)

Os bradizoítas também secretam conteúdos de organelas na matriz do vacúolo parasitóforo, que gradualmente levam ao surgimento de uma parede cística em associação com a membrana do vacúolo parasitóforo e uma rede intracística. A parede do cisto geralmente é fina ($< 0,5 \mu\text{m}$) e formada por uma membrana limitante, adjacente a uma matriz levemente eletrodensa, e uma camada interna onde se observam pequenas vesículas e túbulos (ATTIAS et al., 2020; PORTES et al., 2023).

Devido a sua característica de resistência, os cistos teciduais permanecem infecciosos em carcaças refrigeradas (1°C a 6°C) ou carne picada por até 3 semanas. No entanto, o ultracongelamento da carne a -12°C ou menos, por pelo menos 3 dias, geralmente é eficaz para matar os cistos. Os cistos teciduais geralmente são mortos imediatamente por aquecimento a 67°C ou mais. A sobrevivência dos cistos teciduais em temperaturas mais baixas depende da duração do cozimento. Os cistos teciduais permanecem viáveis a 60°C por cerca de 4 minutos e a 50°C por cerca de 10 minutos (DUBEY, 1998).

Com relação à sua nomenclatura, o termo bradizoita (bradi = lento em grego) foi criado por Frenkel para descrever o organismo multiplicando-se lentamente dentro de um cisto de tecido, porém estes bradizoítas também podem ser denominados cistozoítos. Os cistos teciduais crescem no meio intracelular com os bradizoítas dividindo-se de modo assexuado (Dubey e Frenkel, 1976).

Apesar dos cistos teciduais se desenvolverem em órgãos viscerais como um todo, incluindo os pulmões, o fígado e os rins, os tecidos de maior prevalência são os neurais e musculares, incluindo o cérebro, olhos e músculos (esqueléticos e cardíacos) (BOOTHROYD e BLACK, 2000).

Por outro lado, cistos teciduais intactos não causam dano e podem persistir durante toda a vida do hospedeiro, não provocando uma resposta inflamatória. (DUBEY et al., 1998).

2.2.5 O ESPOROZOITA

Quando os oocistos são liberados com as fezes do gato, o ambiente desencadeia a maturação deste oocisto, ou seja, a esporulação. Os oocistos esporulados são altamente resistentes às condições ambientais e permanecem

viáveis na água ou em condições secas por vários meses (Figura 23). Após a maturação do oocisto, cada esporocisto contém quatro esporozoítas (ATTIAS *et al.*, 2020).

A esporulação ocorre no ambiente no período de 1 a 5 dias após a sua excreção, dependendo da temperatura e arejamento local. Morfologicamente, os oocistos esporulados são subesferas que possuem de 10 a 12 μm de diâmetro, e sob a microscopia de luz, sua parede consiste em duas camadas incolores (SIBLEY, 2011).

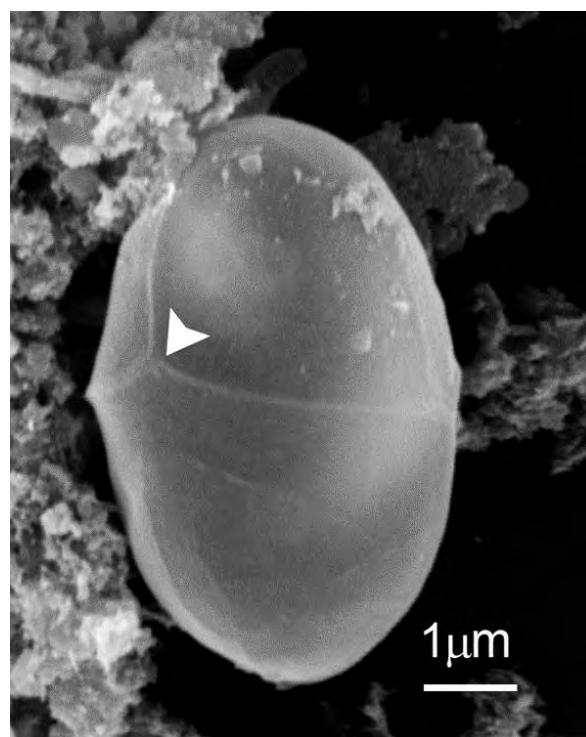


Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura de um esporocisto. Ponta de seta mostrando as linhas de sutura da parede do esporocisto (ATTIAS *et al.*, 2020).

A ultraestrutura da parede do oocisto esporulado consiste em três camadas: (1) uma camada densa exterior de eletrodensa; (2) uma camada de meio elétron lúcida; e (3) uma camada interna de elétrons moderadamente densa. A camada intermédia é composta de dois restos de membranas que foram estabelecidas entre as camadas interior e exterior durante a formação da parede do oocisto (DUBEY *et al.*, 1970).

O esporozoíta é formado através da divisão sexuada. Na formação do esporozoíta o citoplasma do oocisto esporulado tem um grande núcleo com nucleoplasma e o zigoto é limitado por uma unidade de membrana com alguns microporos. O núcleo se divide duas vezes, dando origem a quatro núcleos, que

estão situados na periferia do zigoto, e uma segunda membrana limitante é formada. Após isto, o citoplasma se divide em dois esporoblastos esféricos e são formados dois núcleos, os esporoblastos são alongados e os esporocistos são formados (FRENKEL, DUBEY e MILLER, 1970; ATTIAS *et al.*, 2020).

As duas membranas exteriores dos esporoblastos tornam a camada exterior da parede do esporocisto. Em seguida, o esporocisto desenvolve quatro placas arqueadas para formar a camada mais interna do esporocisto. As placas estão interligadas por quatro suturas lipídicas e com uma depressão na superfície da parede de esporocisto no ponto de união (Figura X) (FERGUSON *et al.*, 1978).

Estruturalmente os esporozoítos possuem em abundância algumas estruturas citoplasmáticas, como os corpos lipídicos, e grânulos de amilopectina, que aparecem como estruturas esféricas que contêm polissacarídeos de reserva (Figura 24) (DUBEY; LINDSAY e SPEER, 1998).

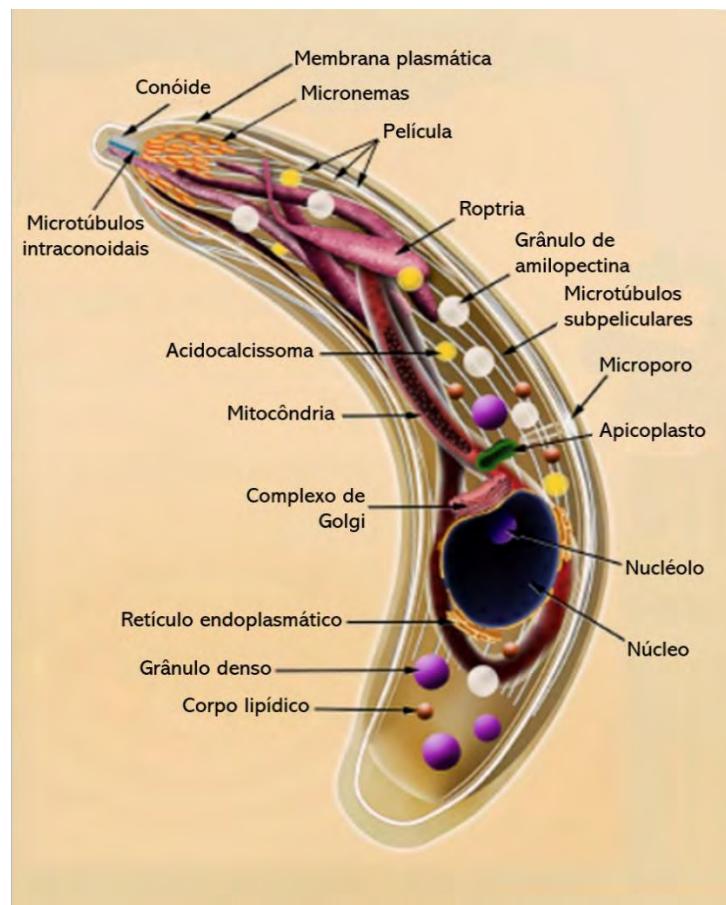


Figura 24: Desenho Esquemático do esporozoíto de *T. gondii* em vista longitudinal. Os esporozoítos são mais alongados que os taquizoítas e bradizoítas e, como os bradizoítas, também possuem grânulos de amilopectina.. (ATTIAS *et al.*, 2020)

2.2.6 ASPECTOS CLÍNICOS DA TOXOPLASMOSE

A Toxoplasmose é uma da doença infecciosa causada pelo parasita *T. gondii* (KALANI *et al.* 2016). O quadro clínico da doença no homem varia em função da idade em que se dá à contaminação, bem como em relação à situação imunológica do mesmo (DUBEY, 2008).

A capacidade do *Toxoplasma gondii* de gerar a doença em seus hospedeiros imunocompetentes e imunodeficientes, juntamente com sua facilidade de uso *in vitro* e disponibilidade de modelos murinos, levou ao seu uso como organismo modelo para estudar como o sistema imunológico controla uma infecção intracelular (PARK e HUNTER, 2020).

Nas infecções que ocorrem durante a gravidez, com a mulher se infectando neste período, há a transmissão vertical pelos taquizoítas que são passados para o feto pela via transplacentária (LOPES-MORI *et al.*, 2011).

Neste contexto, o parasita atravessa a barreira formada pela placenta e infecta o feto, sendo este processo possível dado à modificação do sistema imunológico do hospedeiro, que para impedir a rejeição do feto proporciona uma oportunidade para o parasita atravessar a placenta (HIDE; 2016). Com a ação do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítas diferenciam-se em bradizoítas, formando cistos teciduais ou tissulares que criam diversas sequelas no feto (TIBAYRENE *et al.*, 1991).

Na toxoplasmose congênita, as mulheres com infecção crônica não passam a infecção para o feto durante o desenvolvimento intrauterino, no entanto, as mulheres que contraem a doença durante o período de gestação estão sujeitas a complicações que podem gerar danos neurológicos e/ou oculares ao feto, ou até mesmo causar o aborto (FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2008).

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

De acordo com Gilbert *et al.* (2008) geralmente os casos de toxoplasmose congênita os parasitos invadem todos os órgãos, mas as lesões do sistema nervoso e da retina são características. As síndromes mais comuns quando o

feto sobrevive estão associadas à Corioretinite (90%), as calcificações cerebrais (69%), as alterações neurológicas (60%) e o hidrocéfalo interno ou microcefalia (50%).

Na toxoplasmose pós-natal, De Souza *et al.* (2010) expôs que pode haver a adenopatia, afetando os gânglios cervicais e em alguns casos, há a simulação de um quadro de linfoma. Dentre os casos mais graves da doença pode haver sinais e sintomas como febre, mal-estar, dores musculares e articulares, e ainda no início da infecção, estes casos podem ser acompanhados de prostração e complicações orgânicas como hepatite, esplenite, miocardite e por vezes, meningite e encefalomielite. Dependendo da gravidade, o óbito pode sobrevir em até uma semana.

Porém, a toxoplasmose congênita, e suas sequelas, podem ser evitadas pela prevenção primária, pela triagem sorológica pré-natal e ainda pela triagem neonatal, seguida por tratamento antimicrobiano de recém-nascidos infectados, para evitar danos clínicos (LAGO *et al.*, 2007).

Já em pacientes imunodeficientes a toxoplasmose é extremamente grave, apresentando na maioria dos casos encefalite aguda, o que leva o indivíduo ao óbito em poucos dias. Porém, em alguns casos a evolução pode ser prolongada, em que o paciente pode manifestar a toxoplasmose extra cerebral (ocular, pulmonar ou cardíaca) (BOOTHROYD e BLACK, 2000).

Porter e Sander (1992) relataram que a maioria dos pacientes apresenta febre e dor de cabeça. Dentre as alterações das funções cerebrais existem sintomas de confusão mental, letargia, alucinações ou psicose, perda de memória ou do conhecimento, e até mesmo o coma.

De acordo com SHAPIRO *et al.* (2019) o diagnóstico consiste na busca do parasita em exsudatos e no líquor (Líquido Cefalorraquidiano), em cortes de tecidos ou placenta, ou em impressões de órgãos. Também é realizado o diagnóstico imunológico (por ELISA), o diagnóstico molecular (PCR - reação em cadeia de polimerase), e recentemente tem sido utilizada a semeadura em cultura de tecidos como uma das técnicas de diagnóstico.

Ainda não há tratamentos capazes de curar a infecção por este parasita, entretanto, por outro lado, os indivíduos infectados desenvolvem cistos teciduais de crescimento lento, o que ainda disponibiliza tempo para tratamentos de contenção da infecção em níveis alastrantes (ENGLISH e BOYLE, 2018). O

tratamento da toxoplasmose utiliza quimioterápicos que Dubey (2008) afirmou ter o caráter supressivo, agindo sobre os taquizoítas, mas não afetando a fase crônica, pois os bradizoítas estão protegidos pelas formações císticas.

As informações disponíveis com base em investigações em modelos animais e *in vitro* indicam medicamentos com ação reconhecida contra o parasita e, assim, com potencial para uso na doença humana, entretanto é necessária a realização de mais estudos (DEROUIN *et al.*, 1995).

Atualmente, os principais medicamentos que se demonstraram eficazes efetivamente contra a toxoplasmose aguda de pacientes adultos são combinações de sulfonamidas com pirimetamina. No entanto, o número de opções de fármacos efetivas é baixo e ainda oferecem grande toxicidade nas doses indicadas para o tratamento (BOOTHROYD e BLACK, 2000; DUBEY, 2008).

Outros medicamentos que dispõem de dados relativos ao uso em humanos, em particular e que têm aplicação mais extensiva compõem os seguintes grupos: sulfamídicos: sulfadiazina; sulfametoxazol; diaminopiridinas: pirimetamina; trimetoprim; lincosaminas: clindamicina; macrolídios: espiramicina, azitromicina e claritromicina (DE MENDONÇA, 2014).

Devido a grande importância médica da toxoplasmose é fundamental o desenvolvimento de novas terapias de tratamento para esta doença parasitária. No entanto, existe a dificuldade para o desenvolvimento de compostos que sejam capazes de alcançar o protozoário no interior da célula hospedeira em uma concentração tóxica para o parasita e segura para a célula.

Existem relatos na literatura indicando a coordenação de compostos para uma alternativa para terapia antiparasitária. Como publicado por Ramirez-Macias *et al.* (2011), compostos contendo íons cobre ou cobalto ligados ao ligante HmtpO, onde HmtpO é {5-metil-1,2,4-triazol [1,5-a] pirimidina-7 (4H)-um}, afetam fortemente o metabolismo energético de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*, alterando estrutura de membrana de organelas e induzindo morte celular.

Atualmente é estudado o efeito biológico de compostos metalocomplexos. Compostos inorgânicos que apresentam promissoras atividades biológicas como fungicida, bactericida e antiviral (SINGH *et al.*, 2000; NATH *et al.*, 2001). Horn et

al. (2005) demonstraram que o ligante HPCINOL [1-(bispiridina-2-ylmetil-amino)-3-cloropropano-2-ol] é promissor para o desenvolvimento de metalofármacos.

Portes *et al.* (2015) e Portes *et al.* (2018) publicou os resultados sobre um novo complexo de ferro(III) contendo sulfadiazina que inibe a proliferação e induz a cistogênese do *T. gondii*. Outro composto metalocomplexo promissor é o derivado de Cobre (II), os derivados induziram a diferenciação do taquizoíta em bradizoíta, induzindo a morte por apoptose e interferindo na disposição correta do complexo da membrana interna do parasita, afetando a divisão celular (Portes *et al.*, 2017).

Foi publicado por Martins-Duarte *et al.* (2022) que o composto N-fenil-1,10-fenantrolina-2-aminas foi eficiente para o tratamento da forma bradizoíta do *T. gondii*, causando a lise e morte dos protozoários de forma eficiente.

A ausência de toxicidade às células do hospedeiro atuando apenas nos parasitos é um dos atrativos para utilização desses compostos inorgânicos para avaliação de sua atividade na terapia envolvendo o protozoário *T. gondii*, uma vez que a principal desvantagem da terapia antiparasitária atual é não preservar a viabilidade dessas células.

Deste modo, é importante destacar o trabalho publicado por Duarte *et al.* (2021) que relata a atividade *in vitro* de quimioterápicos coordenados contra o *T. gondii*, e que exercem baixa citotoxicidade celular, sendo estes capazes de reduzir a atividade de enzimas antioxidantes cruciais para a defesa do parasita.

2.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO E A INFLAMAÇÃO

O Sistema Imunológico é constituído por uma gama de tecidos, células e moléculas, se apresentando como a primeira linha de defesa do organismo, e tem por finalidade manter a homeostase ao se manifestar diante a injurias e combatendo substância estranha (antígeno) (CHEN, 2010; ABBAS, 2011; YANG *et al.*, 2020).

A resposta imunológica pode ser dividida em imunidade natural (Inata) e em imunidade adquirida (Adaptativa). Elas atuam em conjunto e utilizam barreiras físicas, químicas e biológicas, além de componentes celulares e moléculas solúveis. Promovem o reconhecimento de estruturas proteicas das substâncias estranhas e posterior ativação de vias bioquímicas intracelulares

que por consequência causam proliferação celular e modificações nos tecidos, por mediadores com efeitos locais e sistêmicos (CHEN *et al.*, 2009; ABBAS, 2011; HAMMEL *et al.*, 2021)

A Imunidade Inata consiste em mecanismos de defesa pré-existentes, que independe do contato prévio com o agente patogênico. Diante disso, representa a linha de defesa inicial que está programada para responder rapidamente as infecções. Por outro lado, há a Imunidade Adquirida, que surge após o estímulo pela exposição aos agentes infecciosos, ou seja, se apresenta em resposta a infecção e consegue se adaptar. Dentre os atributos que conceituam a imunidade adaptativa, é importante destacar a habilidade de identificar diferentes substâncias, o que caracteriza a especificidade em de responder com mais exatidão as repetidas exposições ao mesmo microrganismo, conhecida como memória imunológica (Figura 25) (ABBAS, 2011).

O principal mecanismo que o sistema imunológico utiliza para combater infecções, e lesões teciduais, é o de processo inflamatório. A inflamação é um processo de recrutamento de células e moléculas, denominadas de mediadores químicos, levando a uma complexa reação em resposta à infecção, exposição a toxinas ou lesões no tecido vascularizado, promovendo assim a um acúmulo extravascular de proteínas plasmáticas e leucócitos (CUZZOCREA, 2005; CHEN, 2010). Os principais mediadores inflamatórios ligados à resposta imunológica são as citocinas e quimiocinas, que vão contribuir para a imunopatogênese da inflamação (CHEN, 2010).

A inflamação pode ser de dois tipos: Aguda ou Crônica. A inflamação aguda apresenta um quadro de desenvolvimento rápido, ocorrendo em minutos ou horas, podendo durar por alguns dias. Diante deste cenário, o quadro agudo pode sofrer evolução, gerando a inflamação crônica caracterizada pela demora e manutenção do processo inflamatório, associada a um ambiente infeccioso resistente ou a uma lesão tecidual prolongada (ABBAS, 2011).

Embora a resposta inflamatória tenha a função protetora na promoção do reparo tecidual e no controle de infecções, por conta da ação constante de mecanismos de sinalização, há em grande parte das vezes a lesão e o avanço do processo patológico (COTRAN *et al.*, 1994; MOSSMAN, 1998; WEINER, 2006 ROSS, 1999; COUSSENS, 2002; MURPHY *et al.*, 2010).

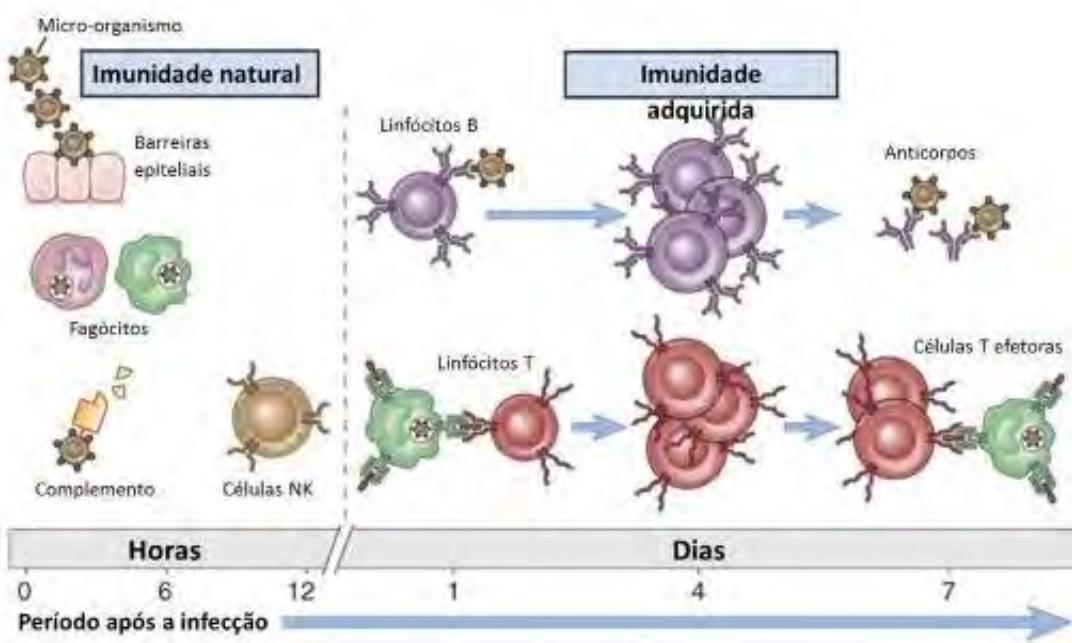


Figura 25:

Figura 25: Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções. A resposta imune adaptativa desenvolvesse posteriormente e consiste na ativação dos linfócitos. (ABBAS, 2011)

A resposta imunológica, seja inata ou adquirida, conta com a participação de células, as quais possuem atividade funcional mediada por citocinas, que são polipeptídeos liberados em resposta a antígenos, e atuam auxiliando no processo de regulação das respostas imunológicas e inflamatórias. Dentre as citocinas envolvidas na imunopatogênese do processo inflamatório, algumas se destacam, sendo estas: (1) Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); e a (2) Interleucina 1 (IL-1). O TNF- α é considerado um dos principais mediadores da resposta inflamatória aguda, podendo ser produzido por fagócitos mononucleares ativados, células NK (*natural killer*) e mastócitos em resposta a padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (ABBAS, 2011; SOMPAYRAC, 2022).

Diversos tipos de microrganismos, como vírus, bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e protozoários, expressam diferentes PAMPs. Os componentes da imunidade Inata reconhecem estruturas essenciais para a sua sobrevivência (PAMPs) e os receptores que se ligam a essas estruturas são denominadas de receptores de reconhecimento de padrões. Além disso, o

sistema imunológico inato pode reconhecer não somente os produtos microbianos, como também células estressadas ou lesadas do hospedeiro, que expressam moléculas que não são abundantes nas células saudáveis (MURPHY, 2010).

As citocinas do tipo quimiotáticas estimulam neutrófilos e monócitos a migrarem para o sítio de infecção e possuem a capacidade de induzir a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, num processo chamado de diapedese, que se baseia nessa migração de células do sistema imune para os tecidos. Também se tem a indução, por citocinas, de fagócitos mononucleares para a produção de IL-1 que atua em conjunto com o TNF- α na inflamação aguda aumentando a expressão de moléculas de adesão. A IL-1 pode ser produzida por fagócitos mononucleares, neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais e sua produção também é induzida por PAMPs (CUZZOCREA, 2005; CHEN, 2010; TAKEUCHI, 2010; SOMPAYRAC, 2022).

As citocinas quimiotáticas, chamadas de quimiocinas são de uma grande família estruturalmente homóloga as citocinas, que estimulam o movimento leucocitário e regulam a migração de leucócitos do sangue aos tecidos (ABBAS, 2011).

Após o processo de quimiotaxia, os agentes patológicos são eliminados por fagocitose e degranulação de neutrófilos e monócitos. Para que ocorra a fagocitose, inicialmente se tem o reconhecimento do agente pelo fagócito. Em seguida, receptores com alta afinidade para essas moléculas como anticorpos, proteínas do sistema complemento e receptores de reconhecimento padrão são ativados (ABBAS, 2011).

Cada uma das principais citocinas produzidas por macrófagos ativados possuem funções específicas. A IL-1 possui a capacidade de ativar o endotélio vascular, ativar linfócitos, promover de modo local a destruição do tecido, além de aumentar o acesso de células efetoras, o que na maioria das vezes causa a febre. O TNF- α também provoca a ativação do endotélio, aumentando a permeabilidade vascular, levando o indivíduo a desenvolver um quadro febril, o que de forma extrema provoca a mobilização de metabólitos e o choque caso a terapia aplicada para o controle do quadro não seja eficiente (MURPHY, 2010).

Neste mesmo cenário, a IL-6 tem a capacidade de promover a ativação de linfócitos e o aumento da produção de anticorpos, também ocasionando febre e

induzindo a produção de proteínas da fase aguda. Outra interleucina importante é a IL-8, uma das quimiocinas que atua no recrutamento de neutrófilos, basófilos e linfócitos T para o local da infecção. Em conjunto a esta resposta, a IL-12 ativa células Natural Killer, induzindo a diferenciação de linfócitos CD4+ para o perfil celular do tipo TH1. Diante deste conjunto de reações, a destruição dos microrganismos ocorre através da ação de células e moléculas específicas que atuam no sistema imune (MURPHY, 2010).

As respostas imunológicas, Inata e Adaptativa, interagem de diferentes maneiras através de seus componentes. A resposta imunológica natural (Inata) fornece sinais que atuam na estimulação, proliferação e a diferenciação de linfócitos T e B para抗ígenos específicos. Na imunidade mediada por células T, os macrófagos são mais eficientes na destruição de microorganismos fagocitados, e na imunidade humoral, pela opsonização (Figura 26). Essa interação acontece a partir de células apresentadoras de抗ígenos (APCs), (MURPHY, 2010; SOMPAYRAC, 2022).

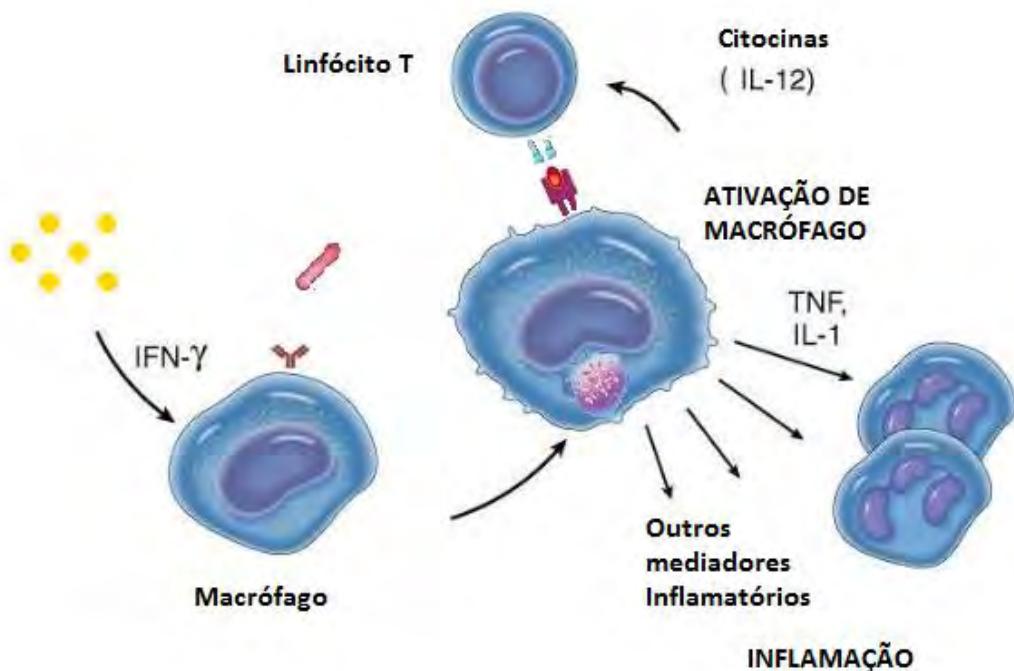


Figura 26: Organização esquemática demonstrando a ativação do macrófago pelo IFN- γ , fazendo com que o mesmo: (1) fagocite microorganismo; (2) libere interleucinas; e (3) faça a apresentação do抗ígeno ao linfócito do tipo T (ABBAS, 2011).

Desta forma, a resposta inflamatória, como uma consequência do mecanismo de defesa do organismo, está presente em todos os momentos da

atividade imunológica, não só no início e na efetivação da resposta inata como já descrito, como também na imunidade adaptativa humoral pela ativação do complemento. A resposta adaptativa celular, quando ocorre a ativação das células T CD4+ por APCs, libera TNF- α intensificando ainda mais o processo inflamatório, que por sua vez tende a favorecer as células auxiliares a seguirem para o perfil TH1, e que deverá atuar no processo de resolução da infecção e/ou reparação tecidual (MURPHY, 2010).

2.3.1 O Macrófago

O sistema imunológico tem como uma de suas características possuir um sistema de células responsáveis pela fagocitose e pela apresentação de抗ígenos, que irão dar origem a respostas em vários tipos de situações de invasão sistêmica por microrganismos (JAWETZ *et al.*, 1995).

Originado na medula óssea, na qual células tronco hematopoiéticas se diferenciam em monoblastos, o conjunto de células fagocitárias do sistema imunológico dá origem aos monócitos, que já presentes na circulação sanguínea possuem a capacidade de se diferenciar em macrófagos quando entram no tecido (JAWETZ *et al.*, 1995; ABBAS, 2011).

O macrófago é a célula mais distinta do sistema mononuclear fagocítico (VAN FURTH, 1972) medindo entre 25 a 50 μm de diâmetro. Sua superfície apresenta grande número de projeções, pseudópodes e invaginações (Figura 27), e o citoplasma grande possui um vasto número de vesículas e vacúolos, que podem ser de secreção ou de reserva (SANTOS e DE SOUZA, 1983).

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

Espalhados pelo citoplasma são encontrados filamentos de actina e microtúbulos, que estão concentrados principalmente próximo à superfície celular e possuem envolvimento direto com a mobilidade dos pseudópodos (DE SOUZA e BENCHIMOL, 1985), bem como no tráfico vesicular e de organelas (ALLISON *et al.*, 1971).

Através de ensaios de microscopia óptica é possível identificar que o macrófago possui um núcleo regular, com formato uniforme e cromatina dispersa. Lisossomos estão presentes espalhados pelo citoplasma, e a região do complexo de Golgi é bem desenvolvida, encontrado próximo ao centríolo. Outra estrutura bem desenvolvida neste tipo celular é o retículo endoplasmático rugoso, estando perto do núcleo e do Complexo de Golgi (IAN, 1973). As mitocôndrias encontram-se em grande número irradiando da região perinuclear para a periferia celular (CARVALHO e DE SOUZA, 1989).

O macrófago tem a capacidade de se apresentar com morfologias distintas, dependendo da sua necessidade de atuação, ao longo do seu desenvolvimento. Após sua estimulação, são denominados Macrófagos Ativados, e com isso 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 lisossomos e de outras estruturas internas aumente, levando a modificações morfológicas perceptíveis. Em casos específicos pode ocorrer a fusão com outros macrófagos formando as denominadas Células Gigantes Multinucleadas (JAWETZ *et al.*, 1995; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1998).

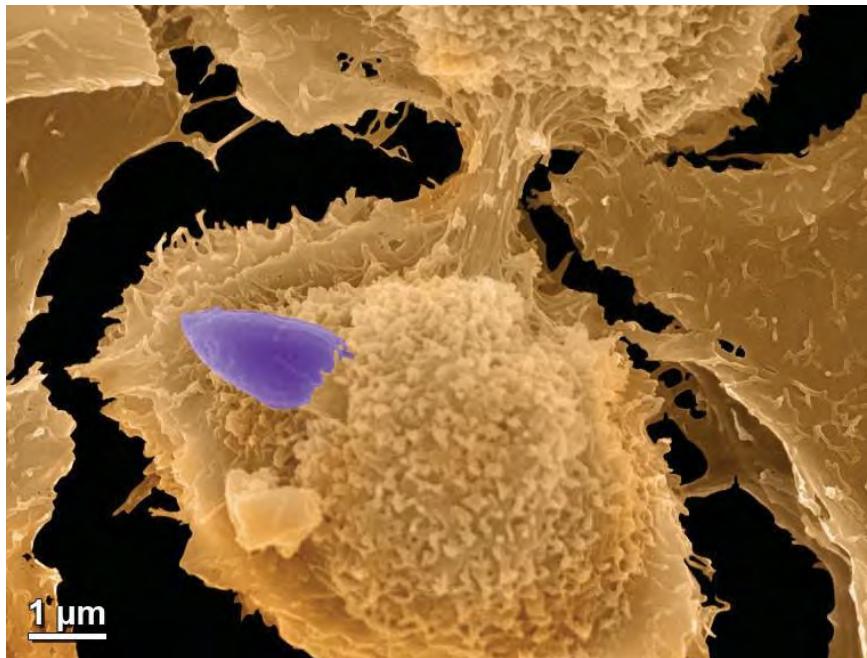


Figura 27: Micrografia eletrônica de varredura de um macrófago sendo invadido pelo *T. gondii* (ATTIAS *et al.*, 2020)

2.3.2 Macrófago: Função e interação celular

Os macrófagos possuem em suas funções principais: (1) a capacidade de eliminar microrganismos através de fagocitose; (2) a possibilidade de apresentar ao sistema imune os抗ígenos que devem ser combatidos, portanto podem ser caracterizados como células apresentadoras de抗ígenos (APCs) através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), e (3) a habilidade de ativar outras células envolvidas com a resposta imune celular. Desta forma, os macrófagos estão envolvidos não só com a resposta imune inata, como também com a resposta adaptativa (ABBAS, 2011; CROOKE *et al.* 2019).

Na resposta imunológica inata, os macrófagos têm como principal função fagocitar os microrganismos invasores e ativar mecanismos de resposta a estes patógenos (ABBAS, 2011).

O processo de ativação dos macrófagos é caracterizado pela capacidade desta célula migratória de realizar funções complexas que o macrófago residente não consegue (ADANS e HAMILTON, 1984; MURRAY, 2017).

Sabe-se que a ativação dos macrófagos está relacionada à resposta imunológica inata ou específica na qual o抗ígeno (patógeno) inoculado é apresentado a linfócitos T que secretam citocinas, como o interferon- γ (IFN- γ),

que irão ativar os macrófagos, podendo estes ser mais ativados se entrarem em contato com LPS (lipopolissacarídeo) ou TNF- α (ADANS e HAMILTON, 1984).

A partir do reconhecimento dos microrganismos pelos macrófagos ou pela interação com o IFN- γ , produzido por células *natural killer*, ocorre o estímulo de receptores presentes na membrana dos macrófagos desencadeando reações intracelulares, dando início ao processo de fagocitose. Dentre os receptores de membrana presentes nos macrófagos estão os receptores com sete domínios transmembranar em α -hélice (ADEREM e UNDERHILL, 1999; MOSSER e EDWARDS, 2008), os receptores de manose, e a proteína que reconhece o LPS. (ABBAS, 2011).

Após esta fase é iniciada a eliminação do microorganismo, com a junção do fagossoma e dos lisossomas presentes no citoplasma contendo enzimas proteolíticas que irão digerir as bactérias, ou partículas estranhas, presentes neste fagolisossoma. Outro mecanismo de eliminação microbiana está ligado à conversão catalítica do oxigênio molecular, onde os fagolisossomas contendo microorganismos 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 microorganismo capturado (MACMICKING *et al.*, 1997).

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

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

Em resposta a ativação dos macrófagos por estes fatores, várias funções passam a se tornar constantes no sistema imune infectado. Através da ativação, os macrófagos aumentam sensivelmente sua capacidade de eliminação de

microorganismos através da fagocitose, onde consequentemente os fagolisossomas associados a enzimas, a ROIs e/ou óxido nítrico atuam na destruição dos microrganismos com maior avidez (ABBAS, 2011).

Paralelamente aos eventos que envolvem a fagocitose, a produção de citocinas ou co-estimuladores do tipo B7 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 (SCHAIBLE *et al.*, 1999).

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

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

A resposta imune bem sucedida requer comunicação entre muitos tipos de células diferentes. Esta comunicação ocorre por meio de proteínas de sinalização solúveis em água, tais como quimiocinas ou citocinas (BALKWILL,

1989), pela formação de sinapses entre as células (FRIEDL *et al.*, 2005) e pela distribuição de proteínas de superfície celular (DAVIS, 2007).

2.3.3 MACRÓFAGO: JUNÇÕES COMUNICANTES

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抗ígenos, eletrofisiologia, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. (LEVY *et al.*, 1976).

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

No final da década de 70, estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão em células progenitoras de macrófagos, advindas da medula óssea de cães, permitiram a análise e a identificação de regiões com a presença de junções comunicantes (PORVAZNISK e 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 e BOLS, 1980).

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

deve a formação de vacúolos exocíticos e endocíticos nas membranas dos macrófagos.

Em 1991 e em 1993, Beyer e Steinberg demonstraram que macrófagos de camundongo e células da linhagem macrofágicas 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.

Em 1996, Alves *et al.* estudaram a presença e a funcionalidade deste tipo de comunicação celular em macrófagos peritoneais de camundongos e células de linhagem macrofágicas J774-A1. De acordo com os dados obtidos tanto os macrófagos quanto as células J774-A1 expressavam Cx43, 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 macrofágicas P388D1 e J774-A1, quando co-cultivadas com células epiteliais intestinais, se apresentavam acopladas entre si ou com as próprias células epiteliais, sugerindo que alguns fatores desta co-cultura poderiam determinar a formação de junções comunicantes funcionais.

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

No ano seguinte, Eugenin *et al.* (2001), através das técnicas de *western blot*, imunofluorescência e injeção intracelular de corantes, demonstraram que culturas de microglia advinda de cérebros de ratos apresentavam junções comunicantes funcionais, apenas quando estas culturas eram incubadas com interferon- γ + TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α) e interferon- γ + 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 + TNF- α e interferon- γ + lipopolissacarídeo (LPS), igualmente aos dados encontrados por este mesmo grupo em experimentos semelhantes com microglia, em 2001. Entretanto, podemos inferir que estes dados conflitantes demonstrados até o presente momento podem estar relacionados ao fato dos macrófagos utilizados nos experimentos terem sido obtidos de fontes diferentes (peritônio, sangue e cérebro).

A seguir, Fortes e colaboradores (2004) demonstrou através de ensaios de RT-PCR, *western blot*, imunofluorescência e injeção de corantes, que células da linhagem macrofágica J774-G8 e macrófagos peritoneais advindos de camundongos suíços expressam junções comunicantes funcionais formadas pela proteína conexina 43, sem a necessidade de qualquer tratamento com citocinas. Assim, foi caracterizada a presença deste tipo de comunicação em macrófagos.

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

2.2.3 Junções Comunicantes X Infecção Parasitária X Macrófagos

As junções comunicantes também executam um papel de destaque em estudos associados às infecções parasitárias (CAMPOS DE CARVALHO *et al.*, 1998). Estudos que envolvem a interação de macrófagos com *T. gondii* têm demonstrado que o parasita possui capacidade de inibir a ativação de

macrófagos (LÜDER *et al.*, 2017) e de reduzir a expressão de conexina e o acoplamento juncional entre astrócitos e células da leptomeninge parasitadas, indicando que esta pode ser uma resposta celular geral à infecção com parasitas intracelulares (CAMPOS DE CARVALHO *et al.*, 1998).

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

Por outro lado, Campos de Carvalho *et al.* (1998) afirmou que tanto o *T. gondii* quanto o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) influenciam as junções comunicantes de uma forma semelhante, sugerindo que a diminuição na comunicação juncional poderia ser resultado de mudanças secundárias no metabolismo celular devido à infecção.

Os estudos com o protozoário *T. cruzi* demonstraram que a infecção parasitária alterou não só a produção de citocinas, como também o padrão de atividade de comunicação intercelular por junções comunicantes. Ainda nesta linha, foi demonstrado que havia a modificação do padrão estrutural da organização da comunicação juncional, bem como o seu perfil funcional (GOLDENBERG *et al.*, 2000).

Astrócitos e células da leptomeninge (pia-máter e aracnóide), quando infectados *in vitro* e *in vivo* por *T. cruzi* e *T. gondii*, também apresentavam a redução no acoplamento celular e na marcação para Cx43 e Cx26, entretanto, os níveis totais de proteína Cx43 não se encontravam significativamente alterados, sugerindo que a infecção interrompe o trânsito e a montagem da proteína em canais juncionais na membrana plasmática (CAMPOS DE CARVALHO *et al.*, 1998).

Estudos em cardiomiócitos de ratos demonstraram que a expressão da proteína Cx43 foi substancialmente diminuída após 72 horas de infecção com o *T. cruzi*. Entretanto, o acoplamento entre células não parasitadas continuou

inalterado em comparação com as células infectadas, indicando que os fatores possivelmente segregados para o meio não eram os responsáveis pelas alterações na distribuição e funcionalidade de Cx43, e sim a presença do parasita no interior da célula, independente de fatores solúveis envolvidos na infecção (CAMPOS DE CARVALHO *et al.*, 1992).

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

Corroborando com este cenário, experimentos anteriores do nosso grupo de trabalho (2021) utilizando a linhagem celular macrofágica J774-G8 infectada com taquizoítas de *Toxoplasma gondii* demonstraram sensíveis alterações relacionadas ao crescimento celular após a interação célula-parasita (DE CARVALHO *et al.*, 2021)

Além disso, neste mesmo estudo, foi possível avaliar as alterações que atingiram o comportamento estrutural das junções comunicantes (Cx43) e dos filamentos de F-actina, que formam o citoesqueleto, através da diminuição da colocalização dessas estruturas em células migratórias do sistema imunológico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a modulação estrutural e funcional das Junções Comunicantes em linhagem macrofágica após a ativação com fatores pró-imuno inflamatórios e a infecção com o parasito *Toxoplasma gondii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o perfil morfológico da linhagem celular J774-G8 infectada com *Toxoplasma gondii*, antes e após o tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios;
- Avaliar a expressão da proteína Conexina 43 através de ensaios imunoelétroforéticos utilizando a linhagem celular J774-G8 infectada com *Toxoplasma gondii*, antes e após o tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios;
- Pesquisar a localização da proteína Conexina 43 através de ensaios de imunofluorescência utilizando a linhagem celular J774-G8 infectada com *Toxoplasma gondii*, antes e após o tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios;
- Analisar a correlação entre a localização/expressão das proteínas Conexina 43 e F-actina (organização de citoesqueleto) utilizando a linhagem celular J774-G8 infectada com *Toxoplasma gondii*, antes e após o tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios;

4 MATERIAIS & MÉTODOS

4.1. CULTURA DE CÉLULAS DE LINHAGEM MACROFÁGICA J774-G8

A linhagem de células macrofágicas J774-G8 (UNKELESS *et al*, 1979), derivada da linhagem americana original J774-A1 obtida de camundongo (*American Type Culture Collection* - ATCC, Rockville, MD), foi cedida pelo Laboratório de Pesquisa em Timo na Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz. As células foram plaqueadas, com uma densidade inicial de 1×10^6 células/ml, em garrafas de plástico de 25 cm^2 (CORNING / USA), em lamínulas de vidro número 1 (Fisherbrand / Fisher Scientific).

As culturas foram mantidas em meio RPMI (*Roswell Park memorial Institute*), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (V/V) (GIBCO), penicilina 1.000UI/ml e estreptomicina 100UI/ml (Sigma- Aldrich). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO_2 .

4.2 OBTENÇÃO DE TAQUIZOÍTA DE *T. gondii*

A obtenção e manipulação dos parasitas foram descritas por Padrão *et al.* (2014). Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (Cepa RH) foram mantidos por passagens de 10^5 parasitas inoculados na cavidade intraperitoneal em camundongos suíços (CF-1). Após 48h de infecção, os parasitas foram coletados em solução salina de tampão fosfato (PBS) através de lavagem peritoneal. O lavado peritoneal sofreu centrifugação (100g; 5'; 4°C), o sobrenadante coletado foi centrifugado (1.000g; 10'; 4°C) para a obtenção das formas taquizoítas. Os parasitas contidos no pellet foram ressuspensos em RPMI e diluídos em fixador (Paraformaldeído 4% em PBS) para quantificação através da câmara de Neubauer ao microscópio óptico convencional.

Taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) foram mantidos e obtidos sob o número da CEUA 2108050821 na Universidade do Estado do Rio de Janeiro, campus Zona Oeste (UERJ -ZO).

4.3 INTERAÇÃO PARASITO-CÉLULA

As células foram plaqueadas em garrafas de plástico de 25 cm² ou em lamínulas de vidro (número 1) organizadas na placa de 24 poços. Após 48h a cultura atingiu a confluência (Freshney, 2005). O taquizoíta de *T. gondii* foi ressuspensionado em meio RPMI e colocado em contato com a célula na proporção 10 parasitas para cada célula. Este foi mantido 1 hora em estufa 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi descartado e substituído por RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, penicilina 1.000UI/ml e estreptomicina 100UI/ml e foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂, no período de 24, 48 e 72 horas.

4.4. TRATAMENTO COM FATORES PRÓ IMUNO-INFLAMATÓRIOS

Os ensaios de tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios foram feitos 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 35mm de diâmetro com células de linhagem macrofágica J774-G8 ativadas com 1 ng/ml de Interferon-γ recombinante de camundongo (IFN-γ; Sigma), 1ng/ml de TNF-α e 100 ng/ml numa janela de 24h, 48h e 72h. (SEABRA, 2002)

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

4.5 CONTAGEM DE CÉLULAS E GRUMOS CELULARES

As micrografias de contraste de fase foram obtidas pelo microscópio invertido (Axiovert 40 CFL, campo claro, contraste de fase, ZEISS, Alemanha) nos aumentos de 100X e 400X. As imagens foram submetidas a uma avaliação qualitativa e quantitativa para avaliação das alterações de morfologia e crescimento celular.

A fim de avaliar os dados obtidos a partir das micrografias de contraste de fase foi realizada a contagem de 11 imagens por variável para análise do número celular total e do crescimento celular sobreposto (crescimento em

grumos de agregados celulares) utilizando o programa Image J, desenvolvido no *National Institutes of Health* destinado a processamento de imagens.

Os resultados foram analisados no programa Prism (Graphpad, USA), utilizando os testes T student e One Way Anova, com análise pelo pós-teste de Bonferroni considerando uma significância inferior a 0,05 ($p<0,05$)

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

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

4.7 IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA

As células estudadas pela técnica de transferência imunoelétroforética ou *Western Blot* após o período de interação na proporção de 1:10 células por parasita e tratamento nos horários de 24,48 e 72 horas, foram lavadas e raspadas em uma solução de bicarbonato de sódio, pH: 8.3, e centrifugadas a 10000 x g durante 10min. Foi adicionado 3 ml de Tween 20 1% e homogeneizado com o auxílio do vortex. O material foi centrifugadas a 10.000 x g durante 5 min e ressuspenso em e armazenadas em solução de bicarbonato de sódio, pH: 8.3 com o coquetel de inibidores de proteases (Inibidores de protease: PMSF – 50 mM em etanol; Leupeptina – 5 mg/ml; EDTA - 200 mM; Aprotinina – 10 mg/ml; E-64 – 1 mM; Pepstatina – 1 mg/ml; Antipain – 10 mM; O-fenantrolina – 200 mM). O material foi armazenado a -20°C.

A separação das proteínas presentes na célula J774-G8 foi feita através da técnica de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Foi adicionado 23 µg de proteína nos géis que foram

preparados em duplicatas, em placas de 1.5 mm de espessura. O gel de empacotamento (stacking gel) foi feito numa concentração a 4% e o gel de corrida (running gel) foi feito numa concentração a 10% em todos os tipos celulares estudados. As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris-Cl, 125 mM; SDS, 4%; glicerol, 20%; β -mercaptoetanol, 10%; azul de bromofenol, 0,4%; pH 6,8) e mantida a temperatura ambiente por cerca de 60 minutos antes de sua aplicação no gel. A corrida eletroforética foi realizada a voltagem constante de 150 mV por 2 horas (sistema BIO-RAD).

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

A membrana foi incubada por 17 horas a 4°C sob agitação com anticorpo monoclonal produzido em camundongo imunizado com peptídeo sintético correspondente a Proteína alfa-1 da junção comunicante (Conexina 43) (AB11369, Abcam, Reino unido) diluído na proporção de 1:1.000 em TBS-T contendo leite em pó desnatado Molico^R a 3%. Após a incubação lavamos a nitrocelulose com TBS-T como descrito anteriormente, sendo logo depois incubada com anticorpo secundário (NXA931, GE Healthcare, EUA) diluído na proporção de 1:5.000 em TBS-T contendo leite em pó desnatado Molico^R a 3%, este está ligado a *horseradish peroxidase* para quimioluminescência, por 2 horas. Após nova lavagem com TBS-T, foi adicionado para a revelação da marcação na nitrocelulose o reagente revelador do kit de amplificação de quimioluminescência da BioRad com a solução de ECL (Substrato de peroxidase para quimioluminescência) acrescentada a Peróxido por 10 minutos para revelação no sistema ChemiDoc MP imaging system BIO-RAD, e avaliado pelo programa Image lab 5.1.

As bandas de proteínas reveladas foram quantificadas por densitometria óptica, utilizando o programa ImageLab da BioRad. Os valores das bandas de

proteínas obtidos nessa análise foram normalizados pela densitometria da banda de proteína totas por Ponceau, utilizada em todo o protocolo experimental do *Western Blot*.

4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células foram fixadas com formaldeído 4% durante 1h em temperatura ambiente. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS-TRITON X-100R em uma concentração de 0,3%, três vezes durante 30 minutos, e logo em seguida incubadas com albumina sérica bovina (BSA-Bovine Serum Albumin, SIGMA, EUA) isenta de imunoglobulinas, diluída em PBS a 2% por 30 minutos. Após o bloqueio as células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-Cx43 descrito na seção de transferência imunoelétroforética, em uma diluição de 1:100 por 2 horas. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, três vezes por 10 minutos e incubadas com o marcador de citoesqueleto Faloidina (F-actina) conjugado com o fluorocromo ALEXA 546 (A12379, Life, California) em uma diluição de 1:100 por 2 horas.

Em seguida, as células foram lavadas com PBS, três vezes por 10 minutos, e incubadas com anticorpo secundário ALEXA 488 (na diluição de 1:400 (A11029, Invitrogen, EUA). Após a lavagem com PBS, como descrito anteriormente, as lamínulas foram marcadas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para marcar o núcleo das células. Elas foram montadas sobre lâminas que continham 10 μ l de Prolong gold^R, (P-10144, Invitrogen, EUA) uma solução que reduz o decaimento da fluorescência.

As marcações nas lâminas foram observadas no laboratório de Imuno Patologia do Instituto Nacional de Cardiologia – Ministério da Saúde, Rio de Janeiro. Para a obtenção da imagem foi realizada a varredura dos planos X e Y para a análise simples e de secções no plano Z (sem a reconstrução tridimensional) no microscópio confocal Nikon Eclipse Ti (Japão), equipado com sistema confocal A1. Para o controle do equipamento, obtenção de dados e análise das imagens foi utilizado o software Acquisition Nis Elements 4.20.

Para a obtenção das imagens os lasers do sistema de emissão foram programados para $\lambda = 405$ nm (DAPI), $\lambda = 488$ nm em laser de Argônio (FITC Alexa 488), e $\lambda = 543$ nm em lazer de gases combinados por Hélio e Neônio

(FITC 546). A especificidade da imunoreatividade foi avaliada na ausência do anticorpo primário.

A especificidade das imunomarcações foi avaliada utilizando o mesmo protocolo acima, substituindo os anticorpos primários nas incubações por soluções de PBS com albumina sérica bovina a 0,1%. Nenhuma marcação foi observada nestas condições.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi plotada no programa Prism da Graphpad. Foram utilizados os testes estatísticos T- student e One Way Anova, com pós-teste de Bonferroni.

Foram utilizados para a análise inferencial valores em um nível de significância inferior a 0,05 ($p<0,05$).

5. RESULTADOS

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

Os macrófagos são as células mais plásticas do sistema hematopoiético encontrados em todos os tecidos. Estas células apresentam grande diversidade funcional, tendo papéis no estabelecimento da homeostase, reparo tecidual e imunidade (TA; CHAWLA e POLLARD, 2013).

A linhagem macrofágica J774-G8, infectada na proporção de 10 parasitas por célula, demonstra alterações morfológicas causadas pela alteração no microambiente de infecção aguda gerado pelo parasita *T. gondii* durante 24, 48 e 72 horas. Neste processo é possível observar as mudanças celulares que ocorrem no processo de infecção, envolvendo a manutenção da sobrevida do parasita no meio intracelular.

A figura 28 mostra micrografias de contraste de fase do processo de infecção das células J774-G8 nos tempos de 24, 48 e 72 horas em cultura. Com o decorrer do tempo podemos observar os danos crescentes causados pelo aumento da parasitemia, na interação parasito-célula, provocando uma sensível diminuição na quantidade de células viáveis. As micrografias foram realizadas em aumentos de 100X (objetiva de 10X), com o objetivo de apresentar um panorama dos danos gerais da cultura, e no aumento de 400X (Objetiva de 40X) para mostrar as alterações específicas e a presença do parasita no microambiente celular.

Observamos que houve alterações em todos os horários de incubação, com 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 aos outros horários de interação (24 e 48 horas), pois as células infectadas foram lisadas pelo parasita aumentando assim a quantidade deste livre em cultura.

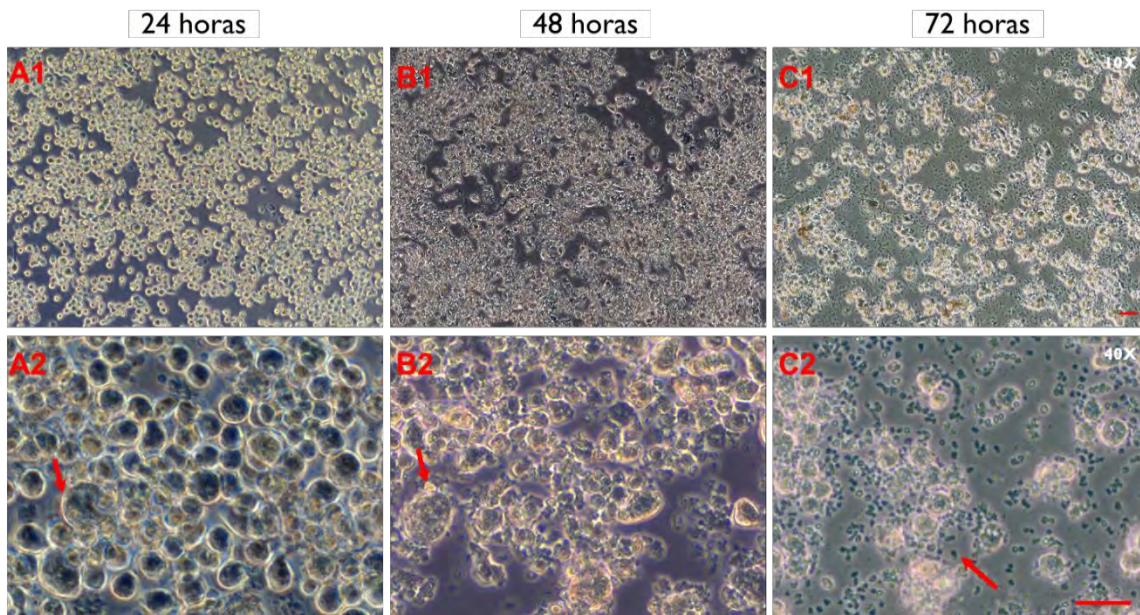


Figura 28: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 controle infectadas com o *T. gondii* (24, 48 e 72 horas) sem o tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios. É demonstrada o perfil de danificação celular nos grupos (A) após a incubação de 24 horas, em (B) após a incubação de 48 horas, e em (C) após a incubação de 72 horas. São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. As setas indicam o *T. gondii*. Barra de calibração em 50 μm.

5.2. FATORES PRÓ-IMUNO INFLAMATÓRIOS: CRESCIMENTO CELULAR E ASPECTOS MORFOLÓGICOS:

A Linhagem Macrófágica J774-G8 foi submetida ao tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios IFN- γ e TNF- α , e de forma combinada associando o IFN- γ + TNF- α após a infecção com o protozoário *T. gondii* nos horários de 24h, 48h e 72h a fim de avaliar se os danos causados pela parasitemia poderiam ser revertidos pela presença dos fatores no microambiente, com o objetivo de reproduzir um ambiente inflamatório. Para tanto, foram feitos tratamentos em tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação com os fatores.

Antes de realizar a análise das culturas infectadas tratadas com os fatores, foram realizados experimentos que pudessem demonstrar possíveis mudanças dinâmicas no crescimento celular, que analisassem especificamente o tempo de crescimento e a morfologia das células quando tratadas com os fatores em comparação à situação controle (sem tratamento). Como é possível

identificar nas micrografias abaixo, não foram observadas alterações significativas (Figura 29).

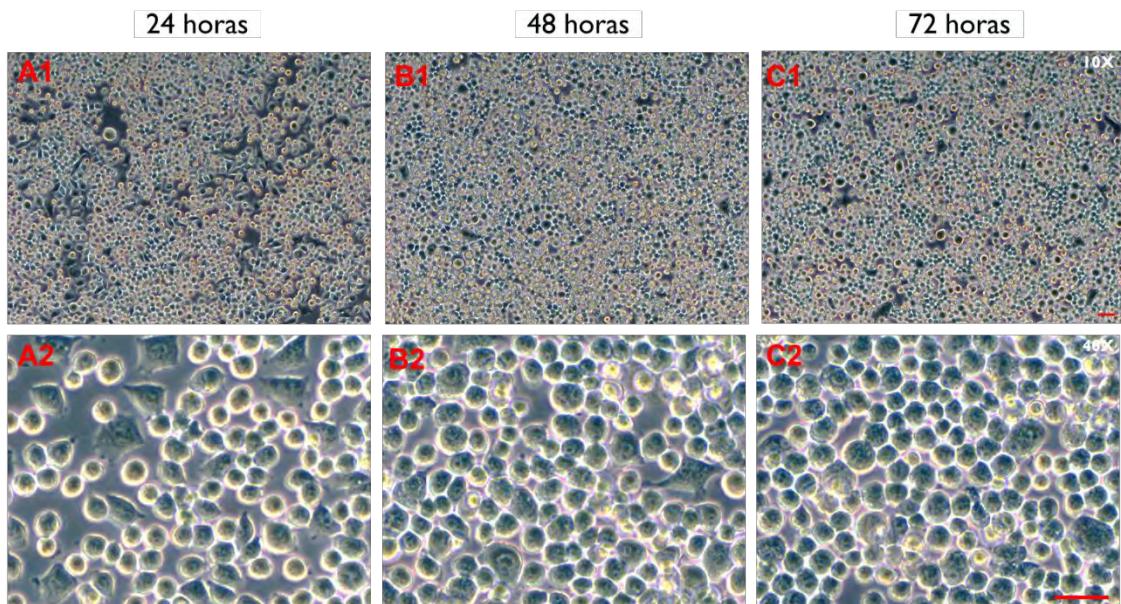


Figura 29: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) (24, 48 e 72 horas). É demonstrada a manutenção das características morfológicas e o crescimento das culturas de célula nos grupos (A) após a incubação de 24 horas, em (B) após a incubação de 48 horas, e em (C) após a incubação de 72 horas. São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. Barra de calibração em 50 μ m.

5.2.1. INFECÇÃO COM *T. gondii* 24 HORAS E TRATAMENTO COM OS FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS:

A figura 30 mostra as micrografias de contraste de fase do processo de infecção das células J774-G8 no tempo de 24 horas e incubadas com os fatores por 24 horas, sendo comparadas as culturas do grupo IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ .

Já a figura 31 mostra as micrografias de contraste de fase do processo de infecção das células J774-G8 no tempo de 24 horas e incubadas com os fatores por 48 horas, sendo comparadas as culturas do grupo IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ . Foi possível observar que nos experimentos em que houve o tratamento com TNF- α e TNF- α + IFN- γ há o início da formação de grumos celulares (agregados celulares).

A figura 32 mostra as micrografias de contraste de fase do processo de infecção das células J774-G8 no tempo de 24 horas e incubados com os fatores por 72 horas, sendo comparadas as culturas do grupo IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ , que apresentaram grumos celulares em todos os tratamentos.

As micrografias foram realizadas em aumentos de 100X (objetiva de 10X), com o objetivo de apresentar um panorama dos aspectos gerais da cultura e 400X (Objetiva de 40X) para mostrar as alterações específicas no microambiente.

Com base nos resultados obtidos, observamos uma sensível melhora no crescimento celular após tratamento com os fatores individuais e combinados, em todos os períodos de incubação, quando comparadas com as culturas infectadas no período de 24 horas.

Este resultado pode nos indicar uma possível melhora do quadro geral da infecção, com o aumento do número de células e a manutenção da morfologia ideal da linhagem celular, além da redução dos parasitas livres no meio.

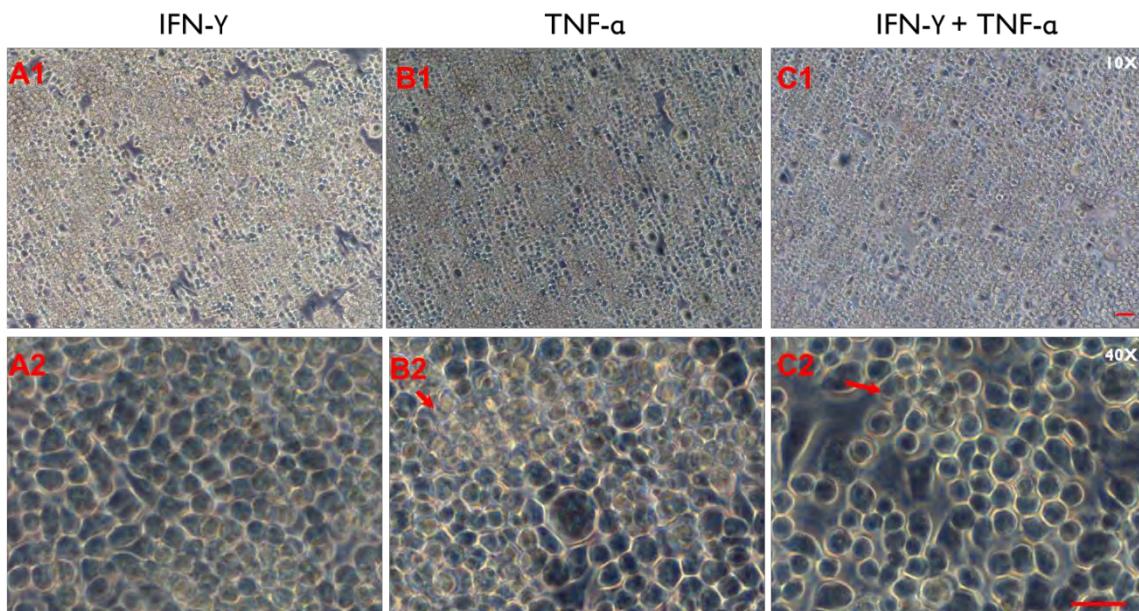


Figura 30: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* (24 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (24 horas). É demonstrada uma pequena redução no dano causado pela infecção nos grupos (A) após a incubação com IFN- γ , em (B) após a incubação com TNF- α , e em (C) após a incubação com o fator combinado TNF- α + IFN- γ . São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. As setas indicam a sobreposição de células. Barra de calibração em 50 μ m.

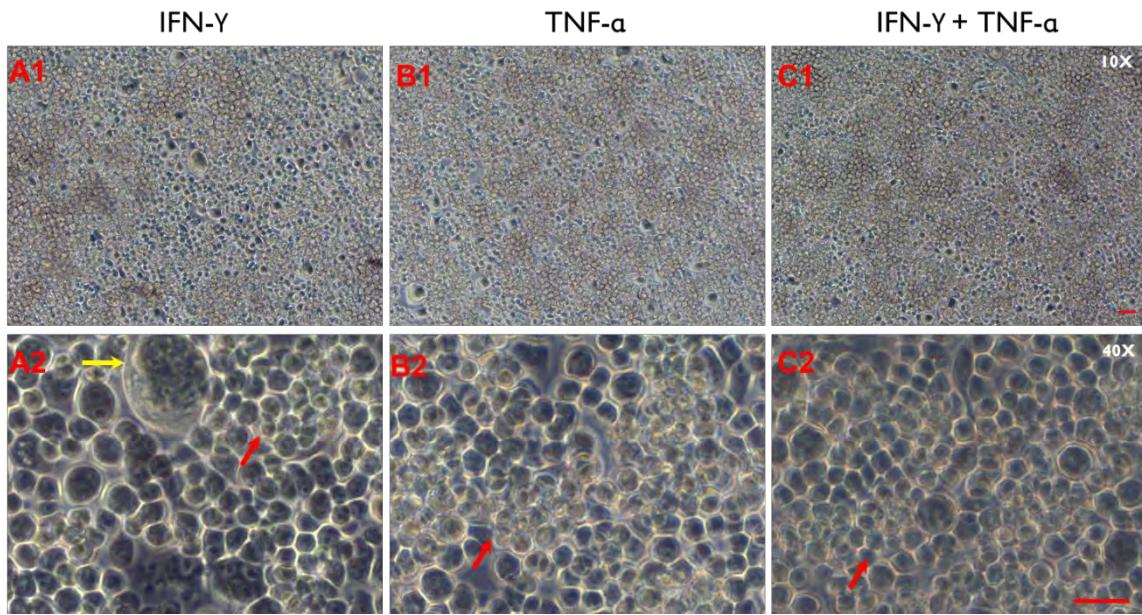


Figura 31: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* (24 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (48 horas). É demonstrada uma pequena redução no dano causado pela infecção nos grupos (A) após a incubação com IFN- γ , em (B) após a incubação com TNF- α , e em (C) após a incubação com o fator combinado TNF- α + IFN- γ . São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. A seta amarela indica o *T. gondii*. As setas vermelhas indicam a sobreposição de células. Barra de calibração em 50 μ m.

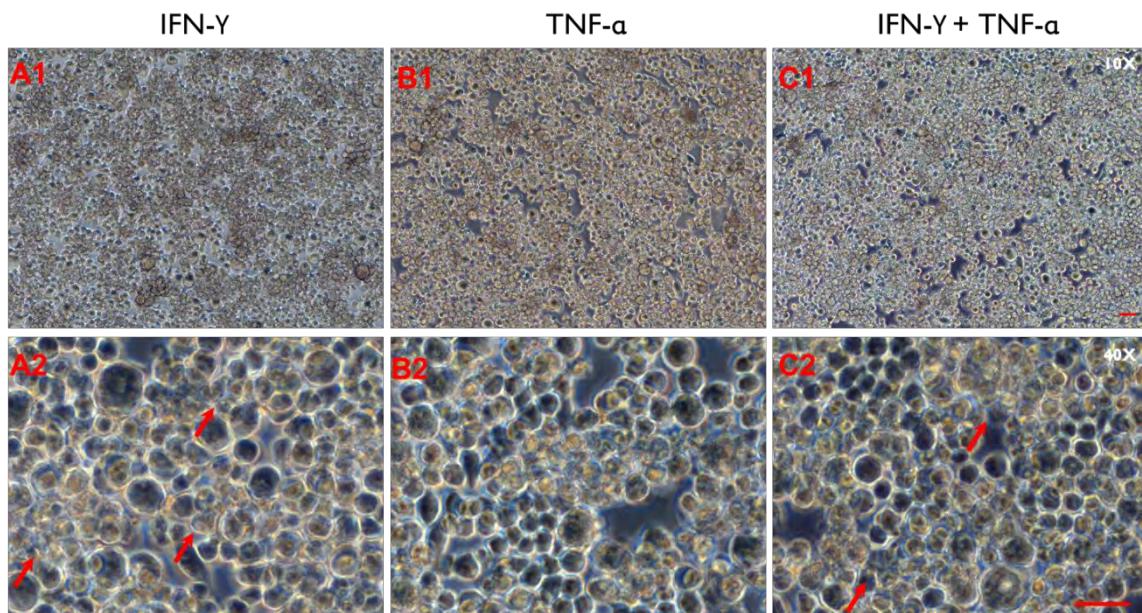


Figura 32: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* (24 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (72 horas). É demonstrado a redução no dano causado pela infecção nos grupos (A) após a incubação com IFN- γ , em (B) após a incubação com TNF- α , e em (C) após a incubação com o fator combinado TNF- α + IFN- γ . São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. As setas vermelhas indicam a sobreposição de células. Barra de calibração em 50 μ m.

5.2.2. INFECÇÃO COM *T. gondii* 48 HORAS E TRATAMENTO COM OS FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS:

A figura 33 mostra as micrografias de contraste de fase do processo de infecção das células J774-G8 no tempo de 48 horas com a incubação das mesmas utilizando os fatores por 24 horas, sendo estas comparadas as culturas do grupo IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ . É possível observar a formação de grumos celulares em todos os tratamentos.

Na figura 34 as micrografias de contraste de fase demonstram o processo de infecção das células J774-G8 no tempo de 48 horas, e incubação com os fatores por 48 horas, sendo comparadas as culturas do grupo IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ . Neste experimento foi observada a manutenção da morfologia da linhagem celular, sem a presença de muitos grumos aparentes.

E por fim, a figura 35 mostra as micrografias de contraste de fase do processo de infecção das células J774-G8 no tempo de 48 horas, sendo estas e incubados com os fatores por 72 horas, e comparadas às culturas do grupo IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ . Neste tempo de incubação foi possível identificar a presença de grumos celulares em todos os tratamentos, sendo que nos tratamentos com IFN- γ e TNF- α + IFN- γ foi observada uma maior quantidade de células em grumos.

As micrografias foram realizadas em aumentos de 100X (objetiva de 10X), com o objetivo de apresentar um panorama dos possíveis danos gerais da cultura, provocados pela infecção, e em 400X (Objetiva de 40X) para que as alterações específicas no microambiente fossem analisadas.

Com base nos resultados obtidos, observamos que em incubações envolvendo todos os períodos há uma melhora considerável do crescimento celular, com a formação de grupos celulares após o tratamento com os fatores individuais e combinados, quando comparadas com as culturas infectadas no período de 48 horas sem o tratamento.

Este resultado pode evidenciar uma possível melhora da resposta celular diante da infecção com o *T. gondii* após a utilização de fatores pró-imuno inflamatórios, já que há um aumento real do número de células no campo de visualização e a manutenção da morfologia celular inerente a esta linhagem.

Neste contexto, o surgimento de grumos celulares pode indicar o aumento do crescimento celular, e um possível aumento da comunicação intercelular com a presença dos fatores no microambiente. Foi identificada uma sensível redução dos parasitas livres no meio extracelular, o que pode traduzir a melhora dos aspectos morfológicos das células sob o tratamento com fatores quando comparadas a célula sem tratamento e infectada (vide o aumento de 400X).

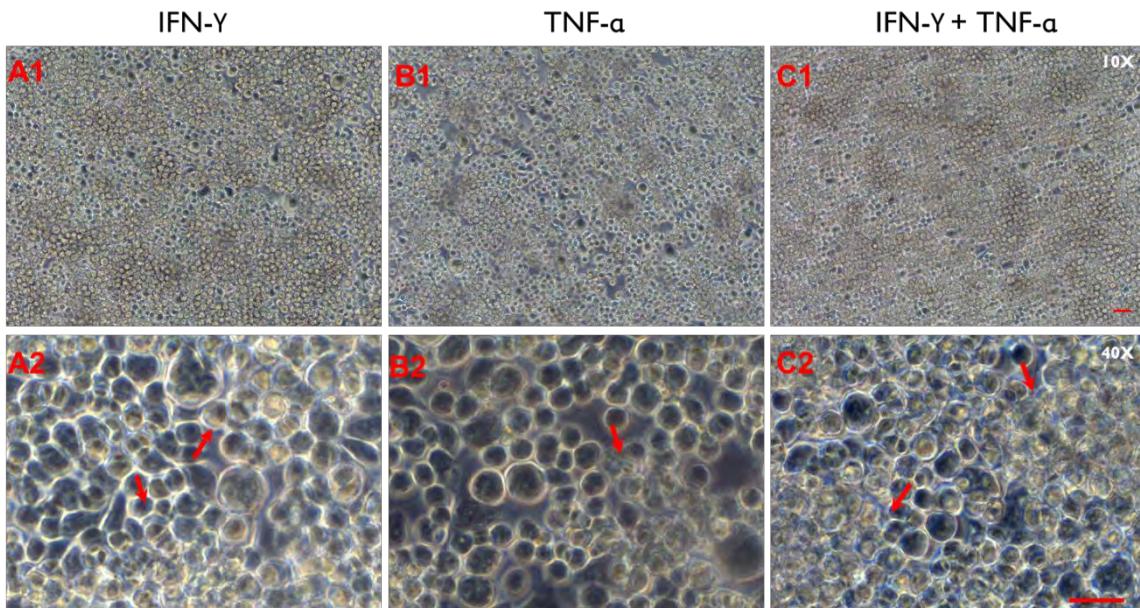


Figura 33: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* (48 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (24 horas). É demonstrada a redução no dano causado pela infecção nos grupos (A) após a incubação com IFN- γ , em (B) após a incubação com TNF- α , e em (C) após a incubação com o fator combinado TNF- α + IFN- γ . São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. As setas vermelhas indicam a sobreposição de células. Barra de calibração em 50 μ m.

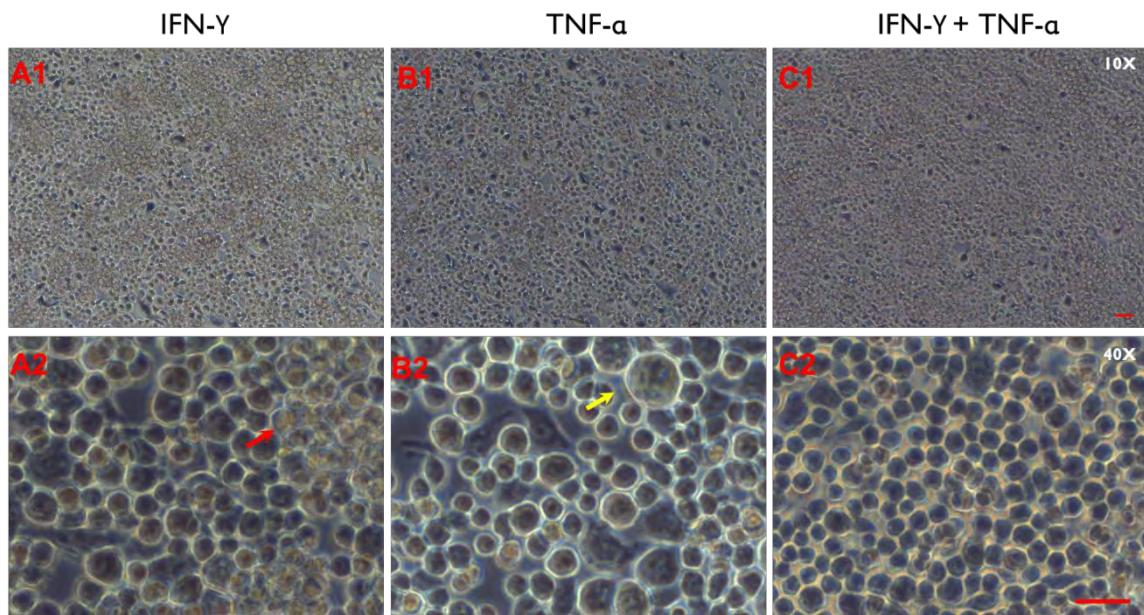


Figura 34: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* (48 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (48 horas). É demonstrada a redução no dano causado pela infecção nos grupos (A) após a incubação com IFN- γ , em (B) após a incubação com TNF- α , e em (C) após a incubação com o fator combinado TNF- α + IFN- γ . São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. A seta amarela indica o *T. gondii*. A seta vermelha indica a sobreposição de células. Barra de calibração em 50 μ m.

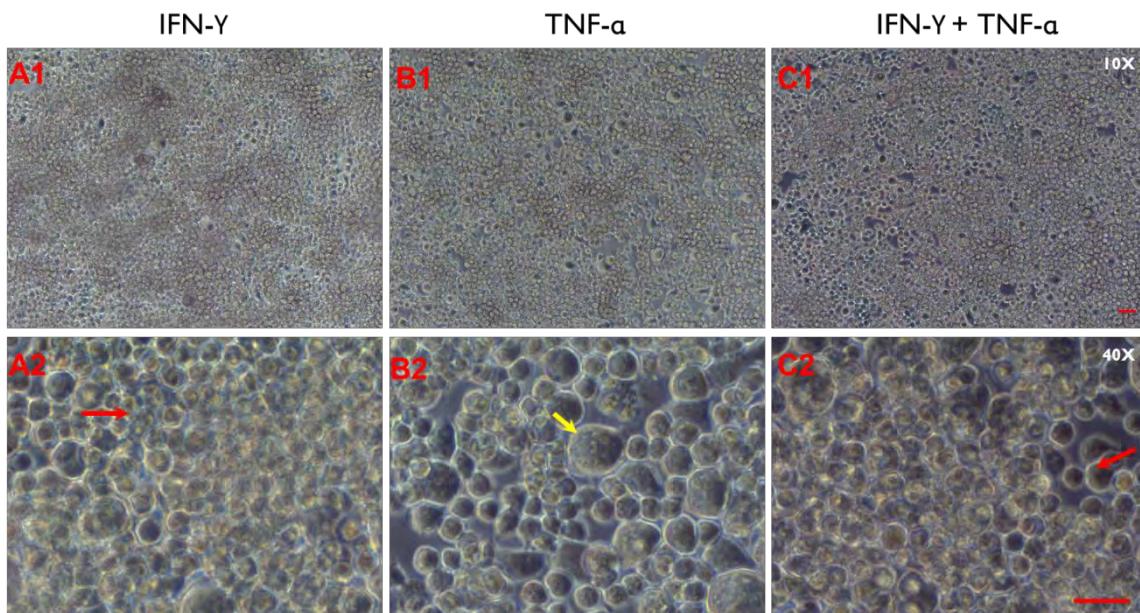


Figura 35: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* (48 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (72 horas). É demonstrada a redução no dano causado pela infecção nos grupos (A) após a incubação com IFN- γ , em (B) após a incubação com TNF- α , e em (C) após a incubação com o fator combinado TNF- α + IFN- γ . São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. A seta amarela indica o *T. gondii*. As setas vermelhas indicam a sobreposição de células. Barra de calibração em 50 μ m.

5.2.3. INFECÇÃO COM *T. gondii* 72 HORAS E TRATAMENTO COM OS FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS:

A figura 36 mostra as micrografias de contraste de fase do processo de infecção das células J774-G8 por 72 horas e incubadas com os fatores por 24 horas, sendo comparadas as culturas do grupo IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ . Foi possível identificar que nos tratamentos com TNF- α e TNF- α + IFN- γ há um util aumento no quantitativo de células.

A figura 37 mostra as micrografias de contraste de fase do processo de infecção das células J774-G8 por 72 horas e incubadas com os fatores por 48 horas, sendo comparadas as culturas do grupo IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ . Foi observando um discreto aumento na quantidade de células em todos os tratamentos quando comparado com as células infectadas por 72h sem tratamento.

Na figura 38 são mostradas micrografias de contraste de fase do processo de infecção das células J774-G8 por 72 horas e incubadas com os fatores por 72 horas, sendo comparadas as culturas do grupo IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ . Neste experimento há um discreto aumento na quantidade de células em todos os tratamentos quando comparado com a célula infectada por 72h sem tratamento, porém a morfologia celular não apresentou melhorias se mantendo alterada.

As micrografias foram realizadas em aumentos de 100X (objetiva de 10X), com o objetivo de apresentar um panorama dos danos gerais da cultura e em 400X (Objetiva de 40X) para mostrar as alterações específicas no microambiente.

Estes resultados indicam que as incubações com todos os fatores apresentaram uma util melhora quanto ao número de células presentes no microambiente, todavia a sua morfologia permanece alterada. Assim, seria possível inferir que os danos causados pela infecção durante 72 horas levariam a uma considerável diminuição número de células (viabilidade celular), dificultando a reversão do quadro infeccioso. Entretanto, as células restantes no microambiente se mostraram unidas, sugerindo que há uma possível manutenção da comunicação, mesmo em um ambiente desfavorável.

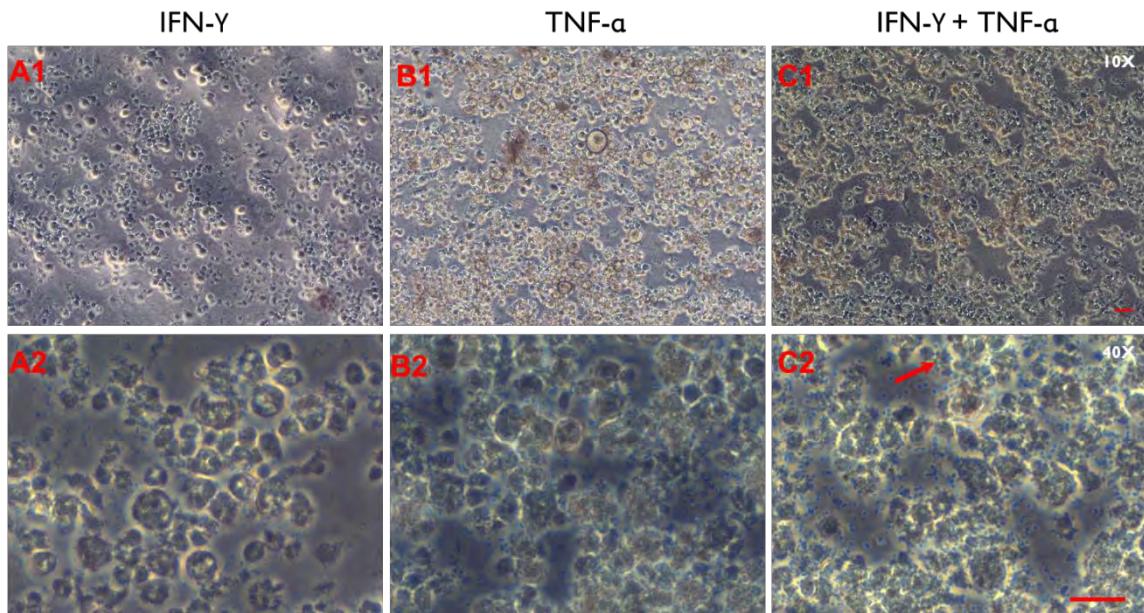


Figura 36: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* (72 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (24 horas). É demonstrada uma discreta melhora nos grupos (A) após a incubação com IFN- γ , em (B) após a incubação com TNF- α , e em (C) após a incubação com o fator combinado TNF- α + IFN- γ . São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. A seta vermelha indica a sobreposição de células. Barra de calibração em 50 μ m.

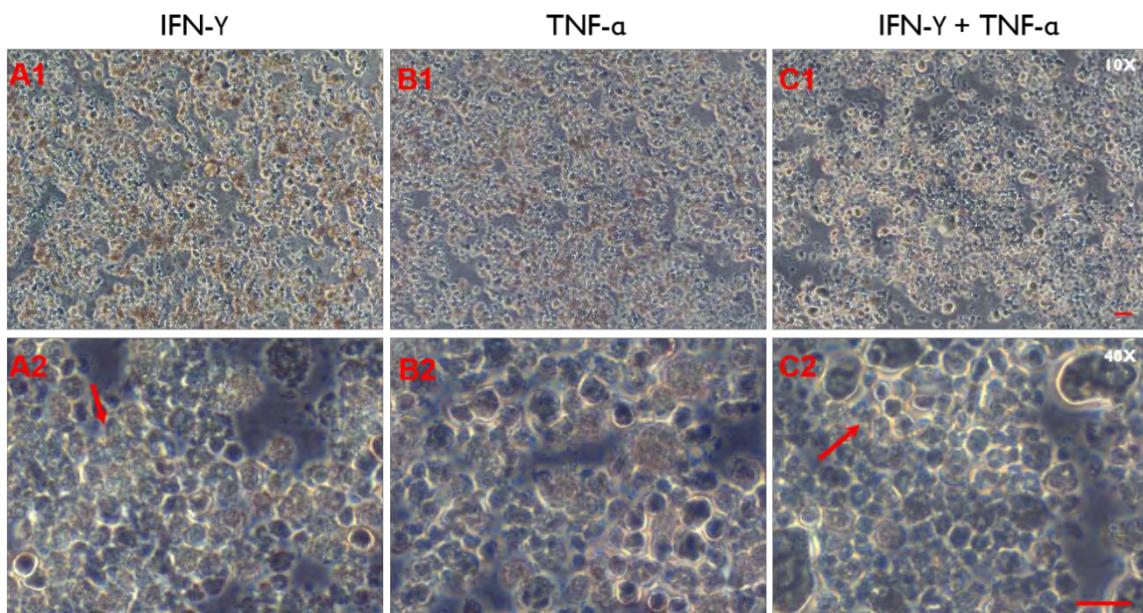


Figura 37: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* (72 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (48 horas). É demonstrada uma discreta melhora nos grupos (A) após a incubação com IFN- γ , em (B) após a incubação com TNF- α , e em (C) após a incubação com o fator combinado TNF- α + IFN- γ . São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. As setas vermelhas indicam a sobreposição de células. Barra de calibração em 50 μ m.

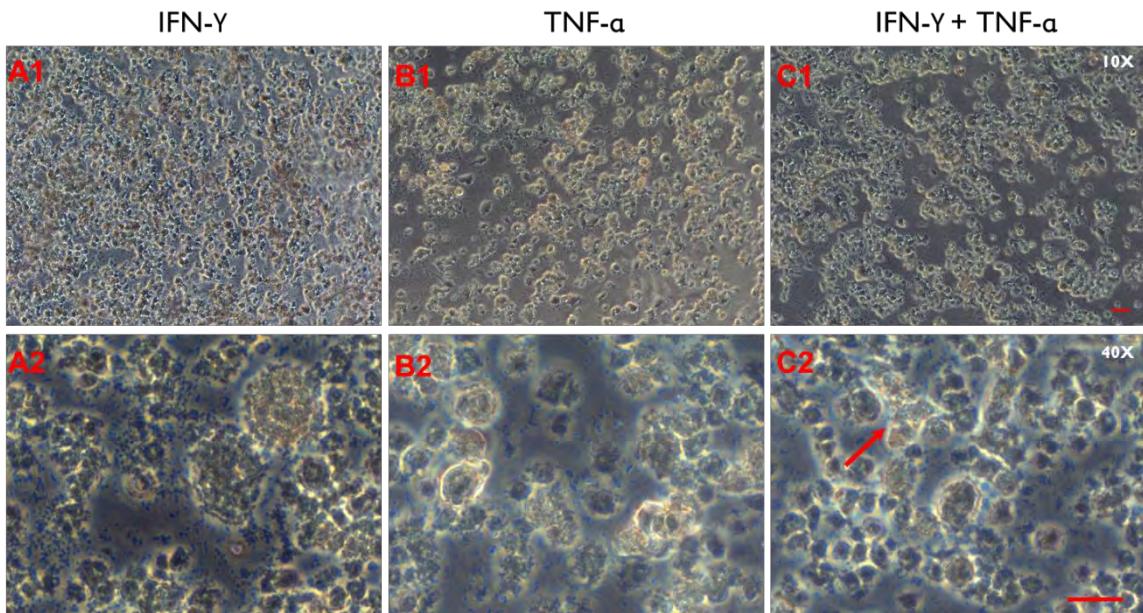


Figura 38: Micrografias em contraste de fase das culturas de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* (72 horas) tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios individuais e combinados (72 horas). É demonstrada uma discreta melhora nos grupos (A) após a incubação com IFN- γ , em (B) após a incubação com TNF- α , e em (C) após a incubação com o fator combinado TNF- α + IFN- γ . São observadas na linha 1 as micrografias obtidas com a objetiva de 10x, e na linha 2 as micrografias obtidas com a objetiva de 40x. A seta vermelha indica a sobreposição de células. Barra de calibração em 50 μ m.

5.2.4. MICROAMBIENTE CELULAR INFECTADO X TRATAMENTO COM FATORES: COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA

A fim de avaliar os dados obtidos a partir das micrografias de contraste de fase foi realizada a contagem das células e dos grumos formados utilizando o programa Image J, desenvolvido no *National Institutes of Health* destinado a processamento de imagens.

Foram utilizadas 11 imagens por variável e os resultados foram analisados no programa Prism (Graphpad, USA), utilizando os testes T student e One Way Anova, com análise pelo pós-teste de Bonferroni considerando uma significância inferior a 0,05 ($p<0,05$).

A figura 39 apresenta o gráfico comparativo gerado a partir da análise do número de células observadas nos campos obtidos das culturas controle e das culturas infectadas com o parasita, sem os tratamentos com os fatores pró-imuno inflamatórios nos horários de 24, 48 e 72 horas.

No horário de 24 horas não há diferença significativa em relação à contagem do número de células quando comparadas as culturas controle e infectadas. Entretanto, nos horários de 48 e 72 horas a diferença na contagem de células é significativa, devido à morte celular causada pelos episódios de infecção e reinfecção com protozoário, liberado pela lise celular.

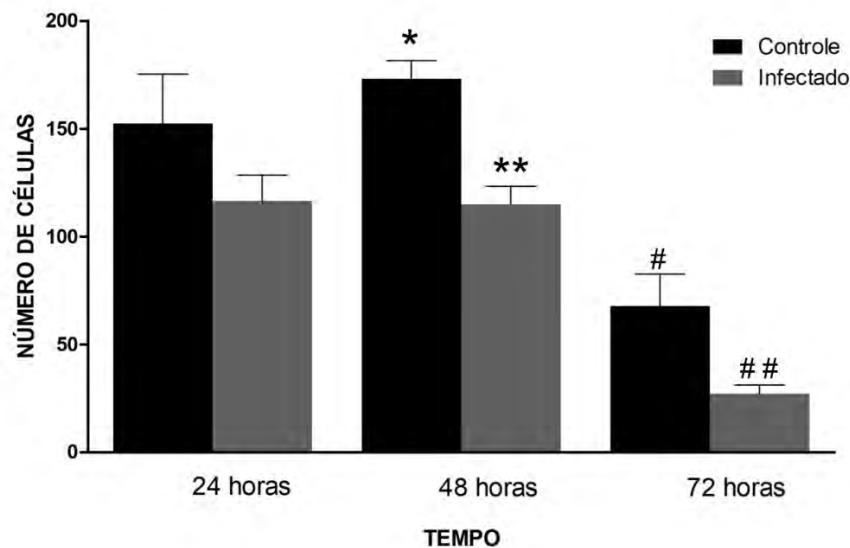


Figura 39: Gráfico comparativo do número de células nas culturas da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 controle (24, 48 e 72 horas) e nas culturas de Linhagem Celular Macrófágicas J774-G8 infectada com *T. gondii* (24, 48 e 72 horas). Total de experimentos: 3. Análise estatística pelo Teste T-student ($p<0,05$). As indicações apontam os valores comparados com diferença estatística.

A seguir são apresentados os gráficos comparativos gerados a partir da análise do número de células e dos grumos celulares, formados pela sobreposição de células após o crescimento celular, nas culturas de células da linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o parasito *T. gondii* por 24, 48 e 72 horas, e tratadas com fatores pró-imuno inflamatórios.

Nas figuras 40 e 41 é observado o conjunto de resultados referentes às culturas de células infectadas que foram tratadas apenas com IFN- γ , nas figuras 42 e 43 os resultados estão associados com as culturas de células infectadas que foram tratadas com TNF- α , e nas figuras 44 e 45 é possível identificar os resultados referentes às culturas de célula infectadas tratadas com IFN- γ e TNF- α conjugados. Vale ressaltar que todos os tratamentos foram avaliados por 24, 48 e 72 horas.

A figura 40 apresenta os gráficos comparativos entre o número de células tratadas com IFN- γ , no qual é observado o aumento do número de células em

cultura após 72h de infecção, e o tratamento por 24 e 48 horas com o fator em comparação com a célula não tratada (figura 40C).

A figura 41 refere-se aos gráficos comparativos da contagem de grumos de células no mesmo ensaio de tratamento com IFN- γ . Neste experimento podemos observar o aumento na quantidade de grumos nas culturas de células J774-G8 em todos os horários de infecção, na qual com 24 e 48 horas de infecção foi observado um significativo aumento destes grumos após 24 e 48 horas de tratamento com o fator (figuras 41A e 41B). Já com 72 horas de infecção, sem tratamento, foi possível observar culturas sem a formação de grumos, que ocorreu em todos os tempos de tratamento, demonstrando que o fator melhora a resistência celular frente ao processo de infecção (figura 41C).

Tratamento IFN - γ

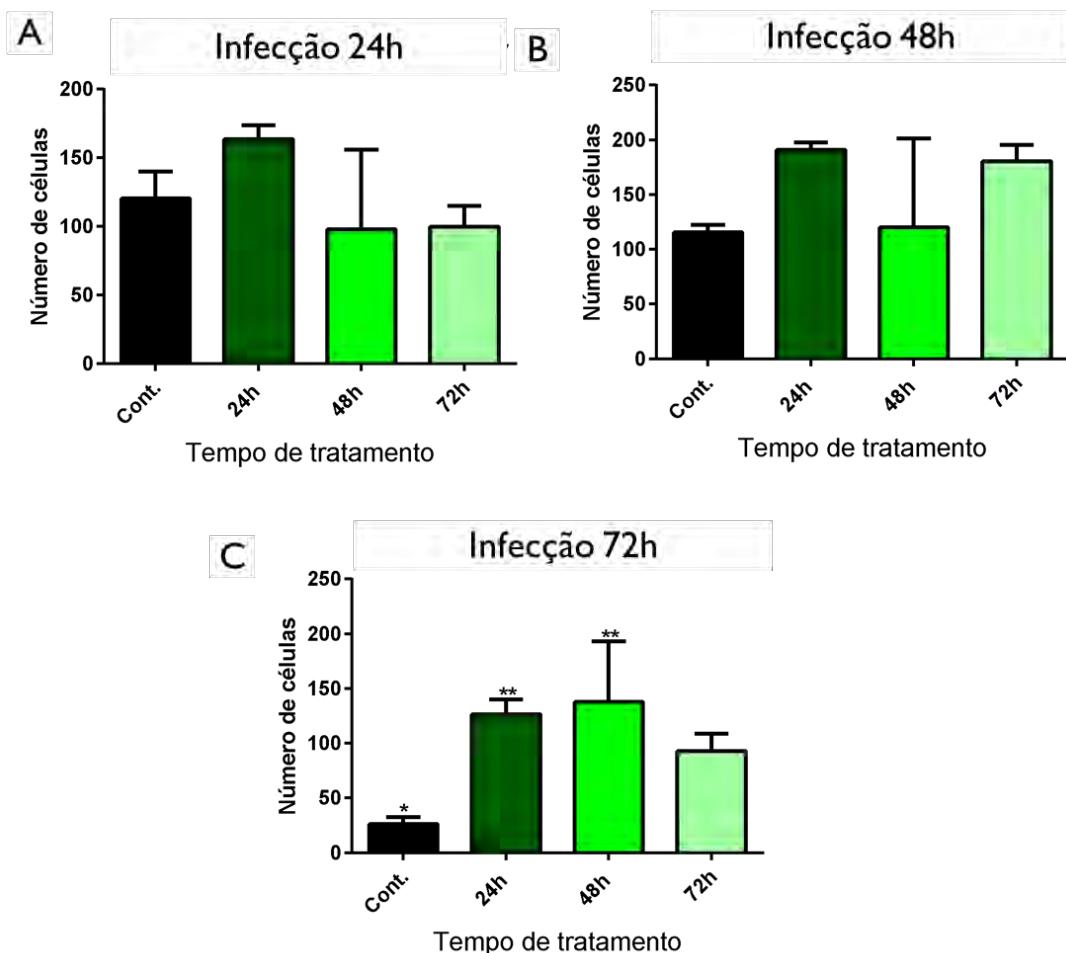


Figura 40: Gráficos comparativos do número de células nas culturas da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com o *T. gondii* sem tratamento (Cont) e tratados com IFN- γ nos períodos de 24, 48 e 72 horas. No gráfico A podemos observar que a infecção foi mantida por 24h antes do tratamento; o gráfico B se refere ao tempo de 48h de infecção antes do tratamento; e no gráfico C podemos observar o período de 72h de infecção antes do tratamento. Nos gráficos

A e **B** não foi observado diferença estatística entre o número de células infectadas sem tratamento e de células infectadas e tratadas (24, 48 e 72 horas). No gráfico **C** é possível observar a diferença estatística entre a célula infectada sem tratamento e o aumento significativo de células após tratamento por 24 e 48 horas. Total de experimentos: 3. $P<0,05$. As indicações apontam os valores comparados com diferença estatística.

Tratamento IFN - γ

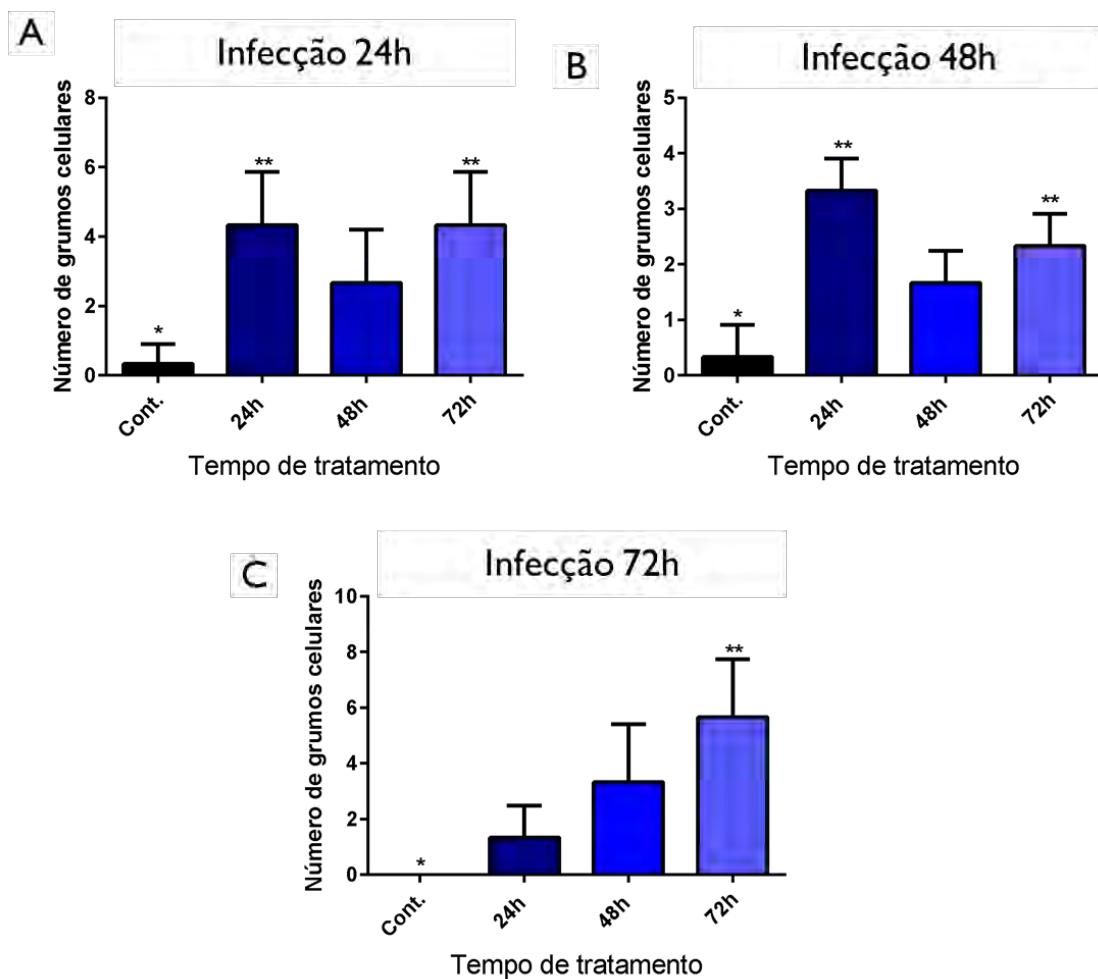


Figura 41: Gráficos comparativos do número de grumos nas culturas da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com o *T. gondii* sem tratamento (Cont) e tratadas com IFN- γ nos períodos de 24, 48 e 72 horas. No gráfico **A** podemos observar que a infecção foi mantida por 24h antes do tratamento; o gráfico **B** se refere ao tempo de 48h de infecção antes do tratamento; e no gráfico **C** podemos observar o período de 72h de infecção antes do tratamento. Nos gráficos **A** e **B** é observado o aumento no número de grumos presentes nas células infectadas sem tratamento e de células tratadas após 24 e 72 horas. No gráfico **C** é possível observar a diferença significativa entre a célula infectada sem tratamento e tratada por 72 horas. Total de experimentos: 3. $P<0,05$. As indicações apontam os valores comparados com diferença estatística.

A figura 42 apresenta os gráficos comparativos entre o número de células tratadas apenas com TNF- α . A partir da análise dos gráficos é possível demonstrar que a contagem de número de células se manteve constante nas culturas infectadas nos tempos de 24 e 48 horas, após os tratamentos de 24, 48 e 72 horas com o fator, o que poderia indicar um aumento da resistência das células frente às lesões induzidas pela parasitemia (figuras 42A e 42B).

Porém, com 72 horas de infecção as culturas tratadas com TNF- α apresentaram um significativo aumento na contagem de células em 24 horas de tratamento, e que ainda se manteve maior que o controle (infetado sem tratamento) nas posteriores 48 e 72 horas de tratamento (figura 42C).

Ainda, no mesmo experimento, foram analisadas as formações de grumos celulares (figura 43). Foi possível identificar, como reproduzido em todos os gráficos, que o número de grumos com células sofreu aumento em todos os tempos de infecção (24, 48 e 72 horas) após os tratamentos em todos os tempos (24, 48 e 72 horas).

Tratamento TNF- α

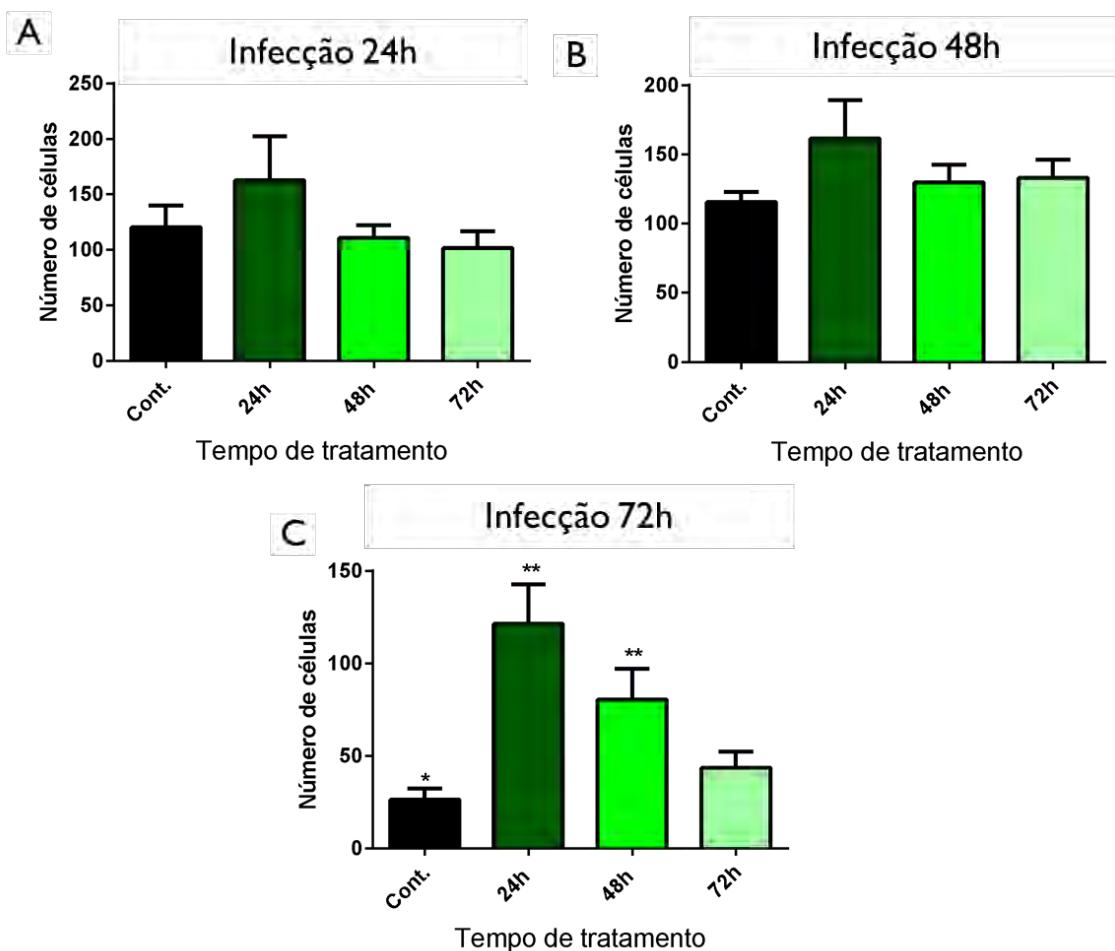


Figura 42: Gráficos comparativos do número de células nas culturas da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com o *T. gondii* sem tratamento (Cont) e tratados com TNF- α nos períodos de 24, 48 e 72 horas. No gráfico A podemos observar que a infecção foi mantida por 24h antes do tratamento; o gráfico B se refere ao tempo de 48h de infecção antes do tratamento; e no gráfico C podemos observar o período de 72h de infecção antes do tratamento. Nos gráficos A e B não foi observado diferença significativa entre a célula infectada sem tratamento e as células infectadas e tratadas (24, 48 e 72 horas). No gráfico C é possível observar o aumento significativo entre a célula infectada sem tratamento e o aumento de células após tratamento por 24 e 48 horas. Total de experimentos: 3. $P < 0,05$. As indicações apontam os valores comparados com diferença estatística.

Tratamento TNF- α

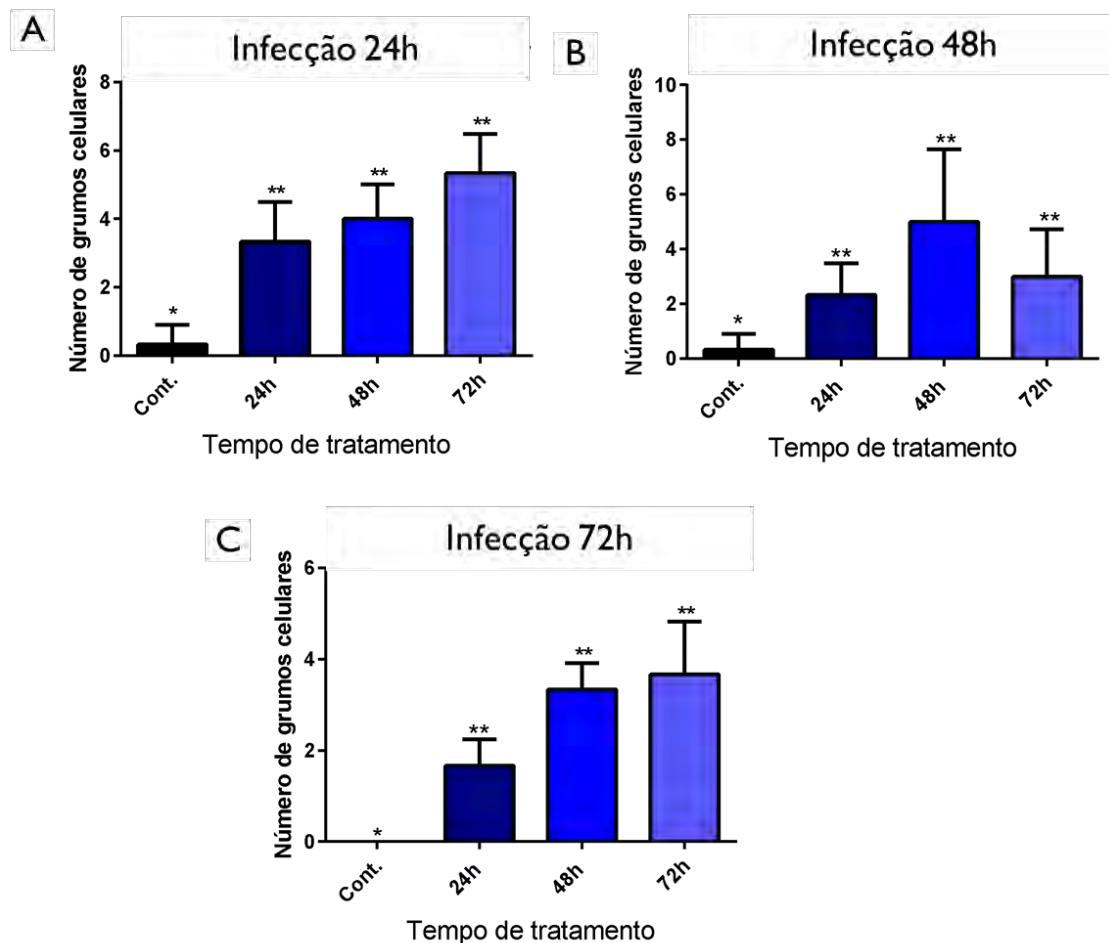


Figura 43: Gráficos comparativos do número de grumos nas culturas da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com o *T. gondii* sem tratamento (Cont) e tratados com TNF- α nos períodos de 24, 48 e 72 horas. No gráfico **A** podemos observar que a infecção foi mantida por 24h antes do tratamento; o gráfico **B** se refere ao tempo de 48h de infecção antes do tratamento; e no gráfico **C** podemos observar o período de 72h de infecção antes do tratamento. Em todos os períodos de infecção foi observado o aumento significativo no número de aglomerados de células após o tratamento (24, 48 e 72 horas). Total de experimentos: 3. $P < 0,05$. As indicações apontam os valores comparados com diferença estatística.

A figura 44 apresenta os gráficos relacionados à contagem de células infectadas e comparadas com as culturas tratadas com IFN- γ e TNF- α de forma combinada. É possível identificar que o número de células foi mantido nas culturas tratadas (por 24, 48 e 72 horas) com os fatores combinados durante 24 e 48 horas de infecção (figuras 44A e 44B). O gráfico referente às 72 horas de infecção indica um sensível aumento na contagem dos números de células em todos os tempos de tratamento com os fatores combinados (figura 44C).

Os gráficos comparativos referentes à formação de grumos de células infectadas com e sem tratamento combinado são demonstrados na figura 45. Como identificado, em todos os tempos de infecção (24, 48 e 72 horas) as células tratadas com os fatores formaram mais grumos do que as células controle, somente infectadas. Neste cenário, é importante dar destaque para os experimentos referentes às 72 horas de infecção, uma vez que sem o tratamento não havia a formação de grumos por conta da alta quantidade de células comprometidas, quadro revertido como demonstrado na figura 45C.

Em comparação com os demais tratamentos, os fatores conjugados apresentaram a melhor resposta celular, sendo expressiva essa diferença, principalmente quando analisada a formação de grumos, independente do tempo de tratamento (24, 48 ou 72 horas) quando comparados com as células infectadas sem tratamento. Diante deste cenário, seria possível atribuir esta resposta à ação aguda e combinada destes fatores, mimetizando o quadro inflamatório que ocorre em microambientes infectados e lesionados.

E mesmo com a diminuição no número de grumos ao passo que os tempos de incubação avançavam (porém ainda maiores que nas células infectadas), a partir de 48 horas de tratamento, deve ser destacado que os grumos formados nas placas apresentaram um volume de concentração celular maior.

Tratamento IFN- γ e TNF- α

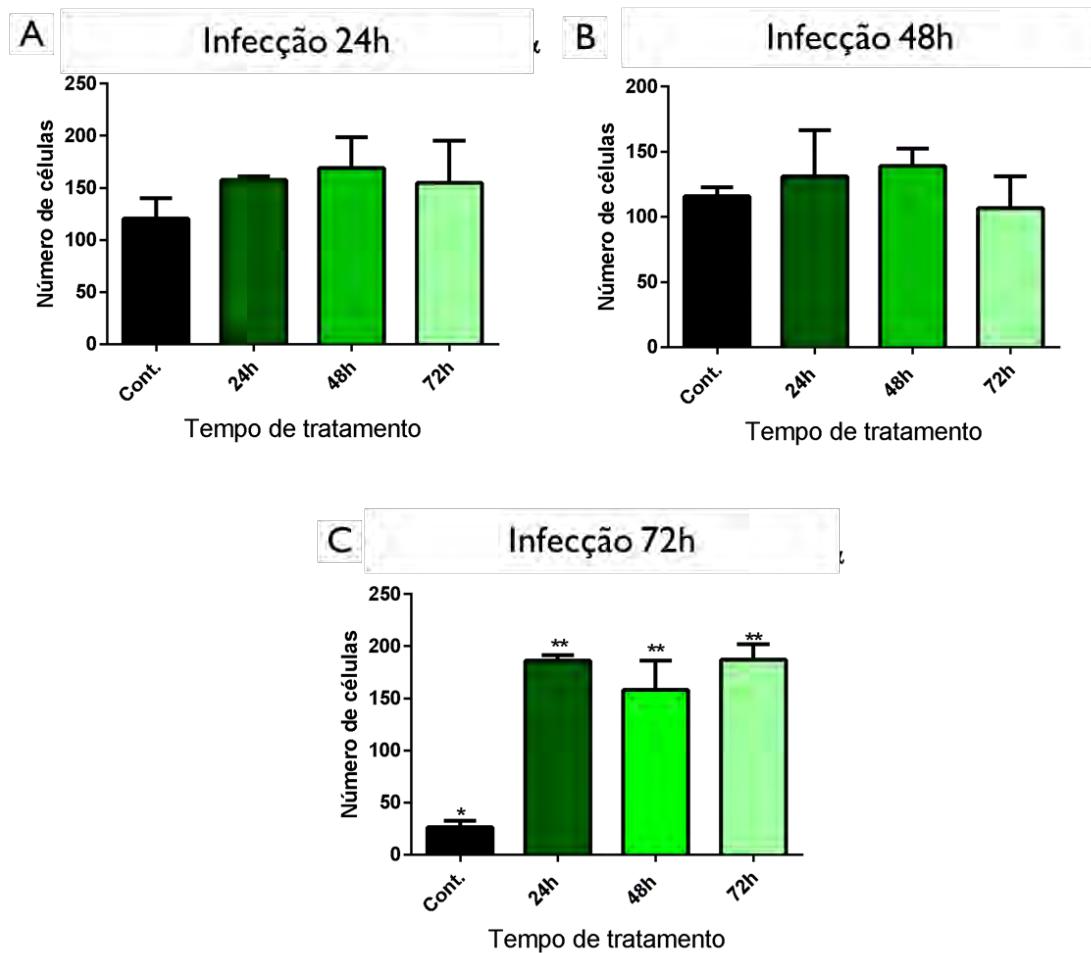


Figura 44: Gráficos comparativos do número de células nas culturas da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com o *T. gondii* sem tratamento (Cont) e tratados com os fatores pró-imuno inflamatórios IFN- γ + TNF- α nos períodos de 24, 48 e 72 horas. No gráfico A podemos observar que a infecção foi mantida por 24h antes do tratamento; o gráfico B se refere ao tempo de 48h de infecção antes do tratamento; e no gráfico C podemos observar o período de 72h de infecção antes do tratamento. No gráfico C é possível observar o aumento significativo no número de células após o tratamento (24, 48 e 72 horas). Total de experimentos: 3. P<0,05. As indicações apontam os valores comparados com diferença estatística.

Tratamento IFN- γ e TNF- α

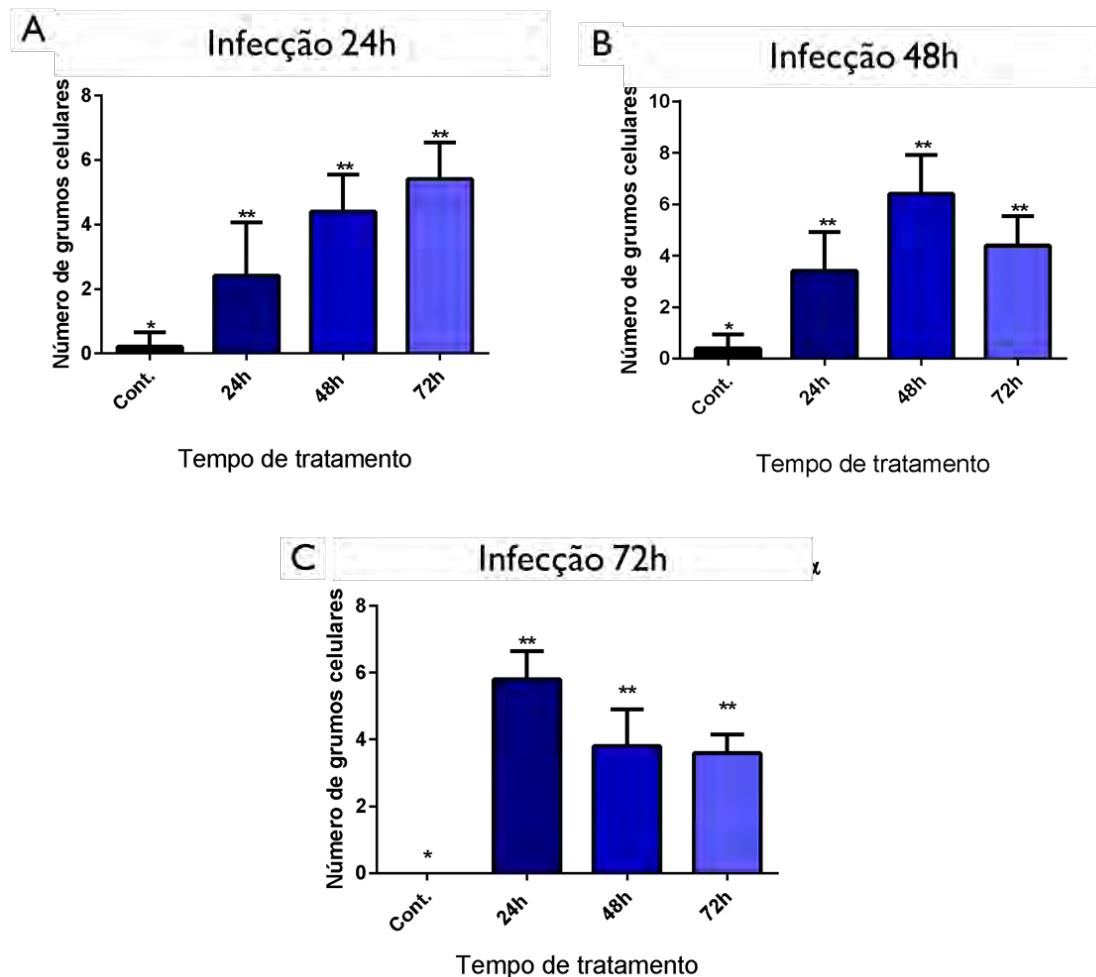


Figura 45: Gráficos comparativos do número de grumos nas culturas da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com o *T. gondii* sem tratamento (Cont) e tratados com IFN- γ +TNF- α nos períodos de 24, 48 e 72 horas. No gráfico A podemos observar que a infecção foi mantida por 24h antes do tratamento; o gráfico B se refere ao tempo de 48h de infecção antes do tratamento; e no gráfico C podemos observar o período de 72h de infecção antes do tratamento. Em todos os períodos de infecção foi observado o aumento significativo no número de aglomerados de células após o tratamento (24, 48 e 72 horas). Total de experimentos: 3. P<0,05. As indicações apontam os valores comparados com diferença estatística.

5.3. WESTERN BLOTTING

Os experimentos imunoelétrotransferência (*Western Blot*) foram realizados para que houvesse a análise da expressão dos níveis proteicos da conexina 43 nas células da linhagem macrofágica J774-G8 controle e infectada (1:10 célula/parasitas) nos horários de 24, 48 e 72 horas, bem como nos

materiais obtidos a partir de culturas infectadas e incubadas com IFN- γ e TNF- α de forma combinada.

Os experimentos a seguir foram realizados apenas com os fatores combinados, pois na avaliação comportamental das culturas infectadas e tratadas, os resultados foram expressivos quando estes fatores eram combinados, bem como nos resultados prévios associados ao experimento funcional de microinjeção de corante nas células com o mesmo tratamento (Anexos 1, 2, 3 e 4).

A partir dos resultados, observamos que a proteína Cx43 foi expressa nas células controle, nas células infectadas e nas células tratadas em todos os tempos de incubação analisados no experimento (24, 48 e 72 horas), como destacado na figura 46.

Na figura 49 também é possível observar que a proteína Cx43 é expressa nas células infectadas por 24, 48 e 72 horas, e nas células que receberam o tratamento com os fatores associados, em todos os tempos de incubação analisados no experimento (24, 48 e 72 horas).

Os dados dos gráficos densitométricos presentes nas figuras 47, 48 e 50 confirmaram os achados visíveis representados na membrana marcada com o anticorpo anti-Cx43. Analisando a membrana e as imagens de densitometria, as bandas referentes ao controle (sem infecção e sem tratamento) não apresentaram alterações, independente do horário, bem como as células infectadas com o parasita, devido ao grande desvio padrão dos dados avaliados (Figura 48).

Entretanto, ao analisar a expressão da proteína Cx43 nas células J774-G8 tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios, foi possível identificar um aumento significativo na expressão da Cx43 nas células após 72 horas de tratamento com os fatores combinados, em comparação com a célula J774-G8 não tratada no tempo de 72 horas (Figura 47B), e em comparação com a célula tratada por 24 horas com fatores combinados (Figura 47A).

Este aumento na expressão induzida pelos fatores pode estar ligado aos dados de Eugenin *et al.* (2003) que observou o aumento do acoplamento celular induzido pelo aumento da Cx43 após o tratamento com IFN- γ e TNF- α , refletindo o aumento na comunicação heterocelular em monócitos/macrofágos.

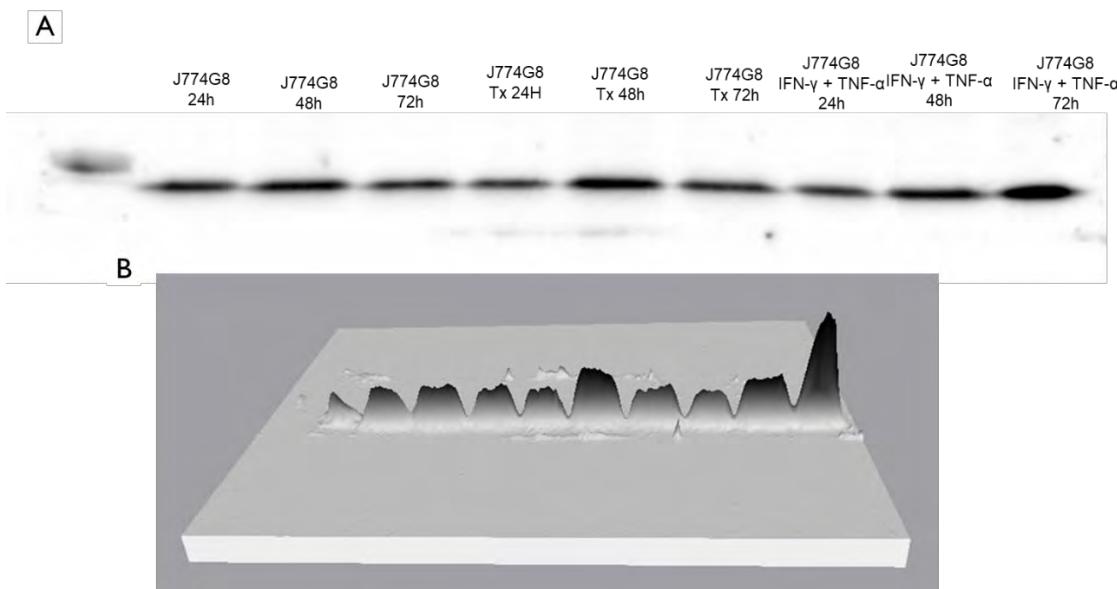


Figura 46: Imagem representativa do experimento de imunoelétrroforese. A figura **A** apresenta a membrana em 2 dimensões, e a figura **B** apresentada a imagem em 3 dimensões. Foram utilizadas de culturas de Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 controle (não-infectada), culturas de Linhagem Celular Macrófágicas J774-G8 infectada com *T. gondii* (24, 48 e 72 horas), e culturas de Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios associados (IFN- γ e TNF- α) (24, 48 e 72 horas). A proteína Cx43 foi detectada nas células J774-G8 controle, infectadas e tratadas. É observado o aumento na expressão de Cx43 em relação ao controle nas (1) células infectadas no período de 48 horas; (2) células tratadas no período de 48 horas; e (3) nas células tratadas no período de 72 horas.

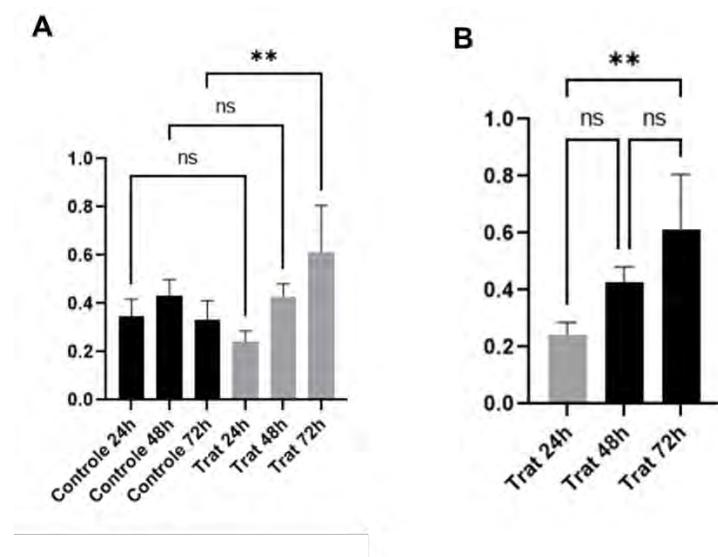


Figura 47: Gráficos densitométricos representativos das bandas observadas na imagem de *Western blot*. No **gráfico A** podemos observar que as colunas relacionadas ao controle não apresentaram alteração significativa entre os horários, entretanto, as colunas referentes a J774-G8 tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios associados (IFN- γ e TNF- α) (24, 48 e 72 horas) apresentaram o aumento na expressão de após o tratamento com aumento significativo em 72 horas em comparação com a célula controle 72 horas. No **gráfico B** podemos observar que as colunas referentes a Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios associados (IFN- γ e TNF- α) no período de 24, 48 e 72 horas. Sendo

significativo a diferença da expressão de proteínas das células tratadas 24 horas em comparação com as células tratadas 72 horas. A barra indica o desvio padrão. Total de 3 experimentos. $P<0,01^{(**)}$.

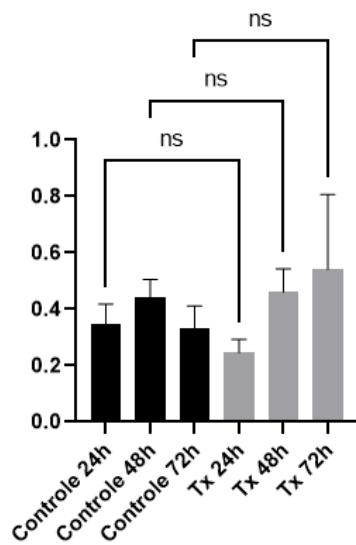


Figura 48: Gráfico densitométrico representativos das bandas observadas na imagem de *Western blot*. Podemos observar que as colunas relacionadas ao controle não apresentaram alteração significativa entre os horários, entretanto, as colunas referentes a cultura da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com *T. gondii* apresentou um aumento não significativo na expressão de proteína com o decorrer do tempo de infecção. A barra indica o desvio padrão. Total de 3 experimentos. $P<0,05$

Nos experimentos a proteína Cx43 foi expressa em células J774-G8 infectadas por 24, 48 e 72 horas e tratadas com os fatores combinados em todos os tempos de incubação analisados no experimento (24, 48 e 72 horas) (Figura 49). É possível observar o aumento da expressão proteica da Cx43 nas células infectadas por 24 e 48 horas quando tratadas por períodos de 48 e 72 horas, entretanto nas células infectadas 72 horas houve uma sutil queda na expressão da Cx43 em 48 e 72 horas de tratamento com os fatores.

Os resultados presentes nas figuras 49A e 49B podem estar associados a resposta celular do macrófago ao estímulo pró-imuno inflamatório, que gera o aumento da capacidade migratória destas células, pois como apresentado por Shen *et al.* (2018), o aumento na expressão de Cx43 consequentemente aumenta a capacidade migratória de macrófagos.

Os dados densitométricos (figura 50) confirmaram os achados visíveis representados na membrana da figura 49 (em 2D e 3D) marcada com o anticorpo anti-Cx43. Analisando as imagens de densitometria é observado que as células

infectadas por 24 horas apresentaram um aumento significativo na expressão da proteína Cx43 quando tratadas com os fatores por 48 e 72 horas, diferentemente do que ocorre após 24 horas de tratamento, em que é possível notar a diminuição da expressão proteica quando comparada a célula infectada por 24 horas e não tratada (figura 50A).

Quando analisadas as culturas infectadas por 48 horas, observamos uma sensível diminuição da expressão da proteína Cx43 após o tratamento com os fatores por 24 horas. Em 48 e 72 horas de tratamento com os fatores combinados foram identificadas as respectivas elevações na expressão da CX43, chegando aos níveis proteicos das células infectadas por 48 horas sem tratamento. Vale destacar que houve significância estatística para o aumento da expressão da Cx43 em todos os tempos de tratamento (figura 50B).

E por fim, ao comparar a expressão proteica da Cx43 entre as células infectadas por 72 horas e as células incubadas com os fatores combinados, foi possível identificar uma acentuada queda nos níveis proteicos em relação às células com 24, 48 e 72 horas de tratamento. Sendo necessário destacar que o decréscimo na expressão de Cx43 foi significativo em 48 e 72 horas de tratamento com IFN- γ e TNF- α .

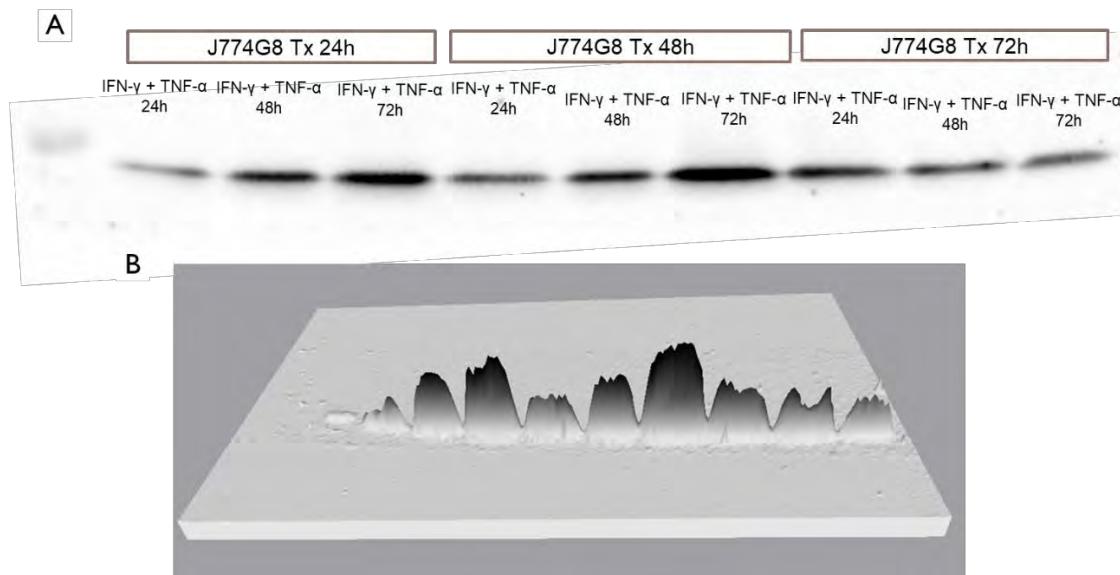


Figura 49: Imagem representativa do experimento de imunoelétrroforese. A figura **A** apresenta a membrana em 2 dimensões, e a figura **B** apresentada a imagem em 3 dimensões. Foram utilizadas de culturas de Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* 24 horas tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios conjugados (IFN- γ e TNF- α) no período de 24, 48 e 72 horas; culturas de Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* 48 horas tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios conjugados (IFN- γ e TNF- α) no

período de 24, 48 e 72 horas; e culturas de Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* 72 horas tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios conjugados (IFN- γ e TNF- α) no período de 24, 48 e 72 horas. A proteína Cx43 foi detectada nas células de Linhagem Macrófágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* (24, 48 e 72 horas) tratadas com os fatores conjugados (24, 48 e 72 horas). É observado o aumento na expressão de Cx43 nas (1) células infectadas 24 horas tratadas no período de 48 e 72 horas; (2) células infectadas 48 horas tratadas no período de 48 e 72 horas; e (3) nas células infectadas 72 horas tratadas no período de 24 horas.

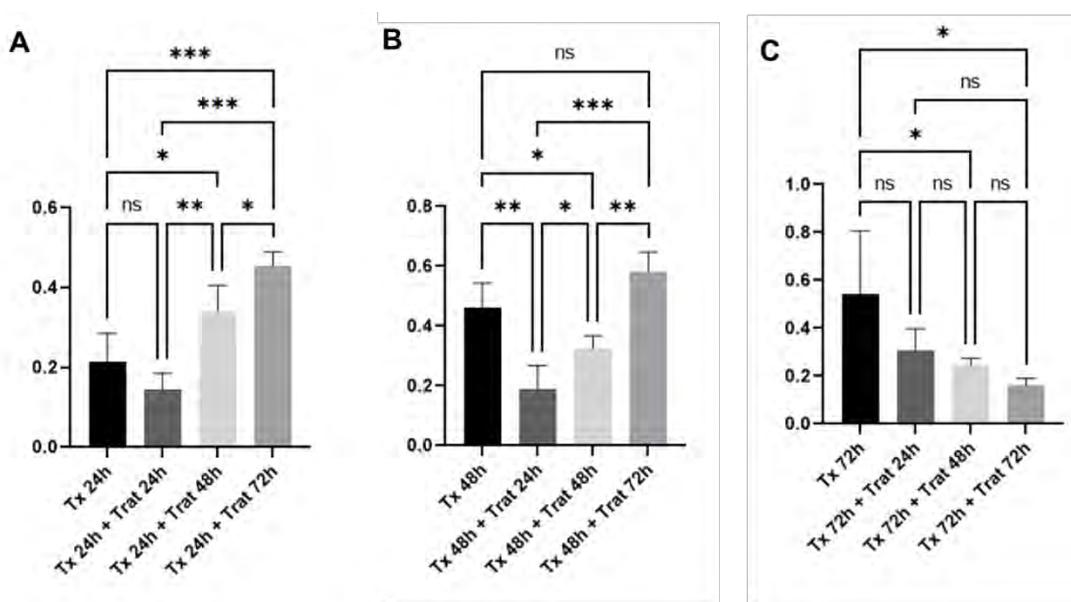


Figura 50: Gráficos densitométricos representativos das bandas observadas na imagem de *Western blot*. No **gráfico A** podemos observar a cultura da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com *T. gondii* 24 horas e a cultura da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com *T. gondii* 24 horas tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios associados (IFN- γ e TNF- α) (24, 48 e 72 horas). No **gráfico B** podemos observar a cultura da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com *T. gondii* 48 horas e a cultura da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com *T. gondii* 48 horas tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios associados (IFN- γ e TNF- α) (24, 48 e 72 horas); e no **gráfico C** podemos observar a cultura da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com *T. gondii* 72 horas e a cultura da Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com *T. gondii* 72 horas tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios associados (IFN- γ e TNF- α) (24, 48 e 72 horas). A barra indica o desvio padrão. Total de 3 experimentos. P<0,05 (*); P<0,01(**), P<0,001(***)

5.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA

A microscopia confocal à laser é uma das técnicas de microscopia de fluorescência mais utilizadas para a análise morfológica e o estudo estrutural de células e tecidos, possibilitando a visualização da colocalização de padrões de expressão de proteínas (BAYGUINOV et al., 2018).

A microscopia confocal permite a observação de uma única linha do plano Z em específico (profundidade), o que garante a análise de marcações em cada

uma das fatias óptica de uma amostra. Além desta possibilidade, é possível avaliar faixas de comprimentos de onda de forma individualizada, evitando as sobreposições dos comprimentos de onda de cada canal de leitura.

Com isso, nestes experimentos, é possível confirmar o acontecimento da colocalização de estruturas celulares após as marcações com os anticorpos ou corantes no momento em que é feita sobreposição de imagens automática, denominada figura Merged.

Vale ressaltar que as imagens obtidas neste conjunto de resultados estão no plano X e Y de uma única fatia óptica de um plano Z.

A fim de avaliar a proteína Cx43 no processo de infecção, tratamento e infecção seguida de tratamento nas células de linhagem macrofágica J774-G8, foram realizados experimentos de imunofluorescência com a marcação simultânea dos anticorpos anti-conexina 43 e Faloidina, que se liga aos filamentos de F-actina, bem como a incubação com o corante DAPI, que marca o núcleo celular.

Os resultados abaixo visam avaliar o posicionamento da proteína Cx43 e a organização estrutural do citoesqueleto de macrófagos de: (1) linhagem J774-G8 controle (não infectada e não tratada); (2) linhagem J774-G8 infectada com *T. gondii* na proporção de 10 parasitas para uma célula nos horários de 24, 48 e 72 horas; (3) linhagem J774-G8 tratadas em 24 e 48 horas; e por fim (4) analisar as alterações que a linhagem J774-G8 infectadas pode sofrer após o tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios IFN- γ +TNF- α mantidos no período de 24, 48 e 72 horas.

As marcações das lâminas foram observadas na análise de secções nos planos X e Y, de um único plano Z, em um microscópio confocal Nikon Eclipse Ti (Japão), associado ao sistema confocal A1, com imagens obtidas pelo software de controle e análise Acquisition Nis Elements 4.20.

Na figura 51 é possível observar a célula de linhagem macrofágica J774-G8 controle (sem infecção ou tratamento). A partir deste resultado podemos analisar a linhagem macrofágica J774-G8 em homeostase, estabelecendo os parâmetros de comparação para com as variáveis presentes nos experimentos.

Nestas células controle é possível identificar a marcação pelo anticorpo anti-Cx43 (verde) e a marcação dos filamentos de F-actina (vermelho), bem como a marcação do núcleo das células pelo DAPI (azul) (figuras 51 B, C e D).

A sobreposição das marcações observada na figura 51A nos permite afirmar que a Cx43 está colocalizada com os filamentos de F-actina na membrana plasmática. Isto, devido a resultante da interação colorimétrica do verde e do vermelho relacionada com os dois anticorpos diferentes utilizados, que resultam na cor amarela observada em regiões da membrana plasmática celular.

Os resultados presentes na figura 51A indicaram o posicionamento da Cx43 em seu local morfológico, unindo sua organização estrutural à sua atividade de manutenção de comunicação entre os citoplasmas de células adjacentes. Além disso, a colocalização da Cx43 com a F-actina sugere que a proteína está interagindo com o citoesqueleto, indicando o processo de ancoramento do canal juncional na membrana plasmática, sendo esta uma organização crucial para a formação de junções comunicantes funcionais.

Este resultado corrobora com a descrição da síntese e transporte da Cx43 amplamente apresentada na literatura. Após a síntese no retículo endoplasmático, a conexina é transportada para o Complexo de Golgi e oligomerizada (SARMA et al., 2001; SEGRETAIN e FALK, 2004; KOVAL et al., 2014). Após a oligomerização, a conexina forma o conexon no interior de vesículas exocíticas, sendo transportado para a membrana plasmática da célula através de microtúbulos (MUSIL e GOODENOUGH, 1993; DHEIN, 1998, GAIETTA et. al., 2002; SEGRETAIN e FALK, 2004; LAIRD 2006).

Paralelamente, a imunomarcação da Faloidina demonstrou que os filamentos de F-actina estão distribuídos de forma homogênea nas células, o que demonstra uma composição organizada do citoesqueleto celular da linhagem macrofágica J774-G8. Deste modo, conseguimos observar a organização do citoesqueleto e a manutenção do arcabouço da membrana plasmática da célula controle, uma vez que a infecção com os parasitas pode alterar a organização celular, segundo a literatura.

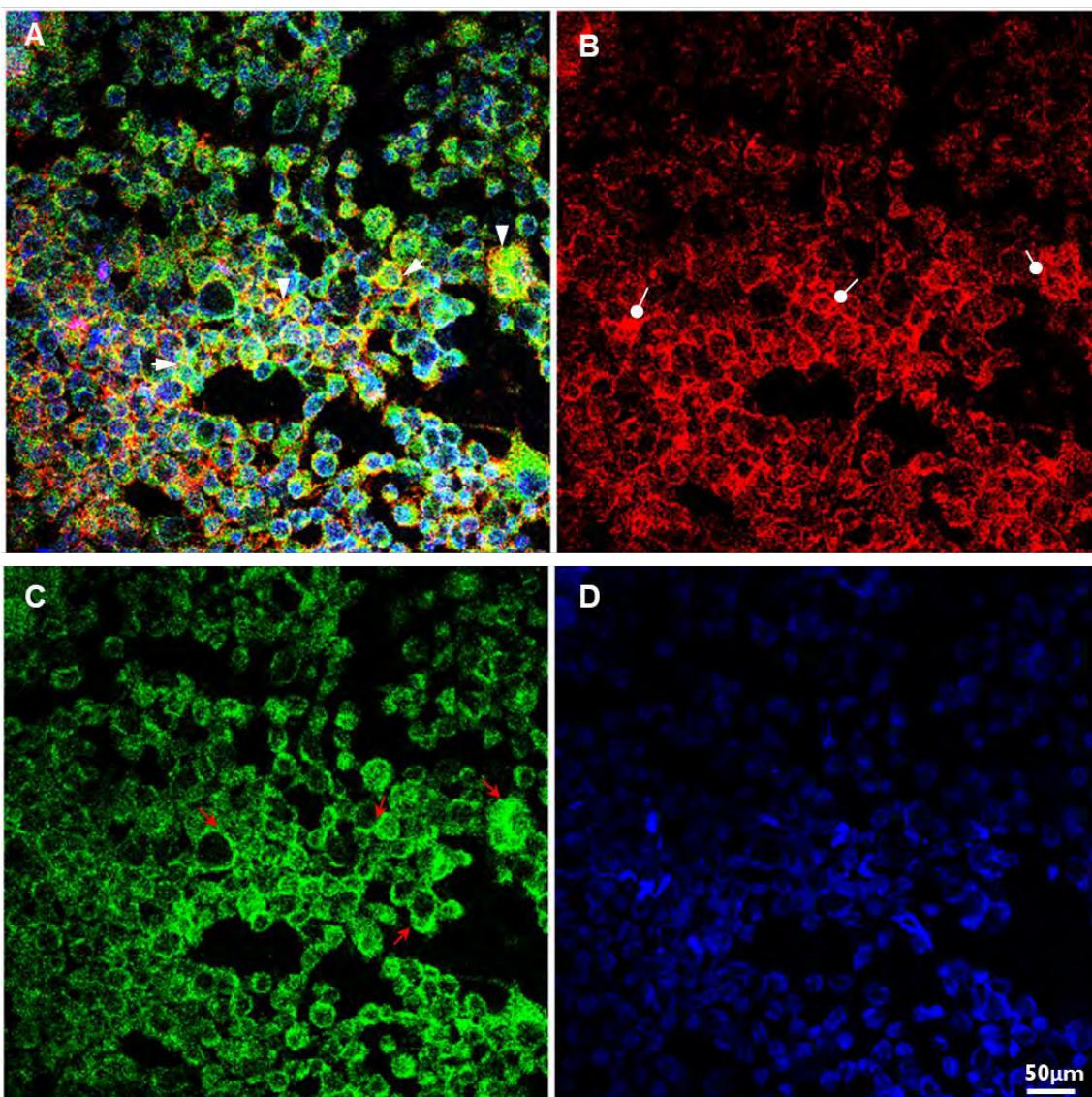


Figura 51: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 controle. Na imagem **A** é apresentada a sobreposição das imagens **B**, **C** e **D**, demonstrando pela indicação com cabeça de seta a colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho) em amarelo. A imagem **B** apresentada a marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular organizado é destacado pela indicação com a bola-seta. A imagem **C** apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização da Cx43 na membrana plasmática. A imagem **C** apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

Nas figuras 52 e 53 é possível observar a célula de linhagem macrofágica J774-G8 (não infectadas) e tratadas com a combinação dos fatores IFN- γ +TNF- α , nos períodos de 24 e 48 horas respectivamente.

Este experimento teve como objetivo observar possíveis alterações que pudessem ocorrer na distribuição da Cx43 e na organização do citoesqueleto na linhagem J774-G8 tratada, sem infecção. Com isto, pudemos estabelecer uma

linha de comparação relacionada com a resposta da ativação celular antes da interação com o *T. gondii*, e nos tratamentos pós-infecção que seriam realizados.

A figura 52 apresenta a célula tratada por 24 horas com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados. Podemos observar a marcação pelo anticorpo anti-Cx43 em verde e a marcação dos filamentos de F-actina em vermelho, bem como a marcação do núcleo celular pelo DAPI em azul (figuras 52B, 52C e 52D). Após a sobreposição das marcações (figura 52A) foi observada a redução da marcação para a proteína Cx43 na membrana plasmática, sendo esta concentrada no citoplasma da célula.

Ao compararmos a marcação das células J774-G8 controle com as células J774-G8 tratadas, observamos uma sensível redução da marcação de Cx43 na membrana celular após o tratamento de 24 horas com os fatores. Como descrito na literatura, na presença dos fatores pró-imuno inflamatórios os macrófagos alteram o seu comportamento fisiológico para o seu estado de ativação, o que permite o remodelamento da célula que deverá atuar na resposta imunológica relacionada ao dano tecidual e infeccioso.

A figura 53 apresenta a célula tratada por 48 horas com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados. Podemos observar a marcação pelo anticorpo anti-Cx43 (verde) localizada em maior quantidade no meio intracelular, a marcação dos filamentos de F-actina que compõem o citoesqueleto celular em vermelho, e a marcação do núcleo celular pelo DAPI em azul (figura 53B, 53C e 53D). Após a sobreposição das marcações (figura 53A) foi observada não só a redução da expressão da Cx43 na membrana plasmática (como maior marcação no citoplasma), como também a diminuição dos pontos de colocalização com o citoesqueleto.

É importante destacar que os macrófagos exibem grande plasticidade, desempenhando uma capacidade ímpar de alterar sua fisiologia em resposta a estímulos, e assim, alterar seu comportamento funcional. Portanto, o ambiente inflamatório tem a capacidade de modular o estado de ativação de macrófagos em processos infecto-inflamatórios (TA; CHAWLA e POLLARD, 2013).

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória que ativa células macrofágicas, que a partir deste evento passam a apresentar um fenótipo pró-inflamatório secretando uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo TNF- α , IL1 e Óxido Nítrico (NO). Estes mediadores ativam mecanismos de defesa

antimicrobianos, incluindo processos oxidativos que contribuem para a morte de organismos invasores (MURRAY e WYNN, 2011).

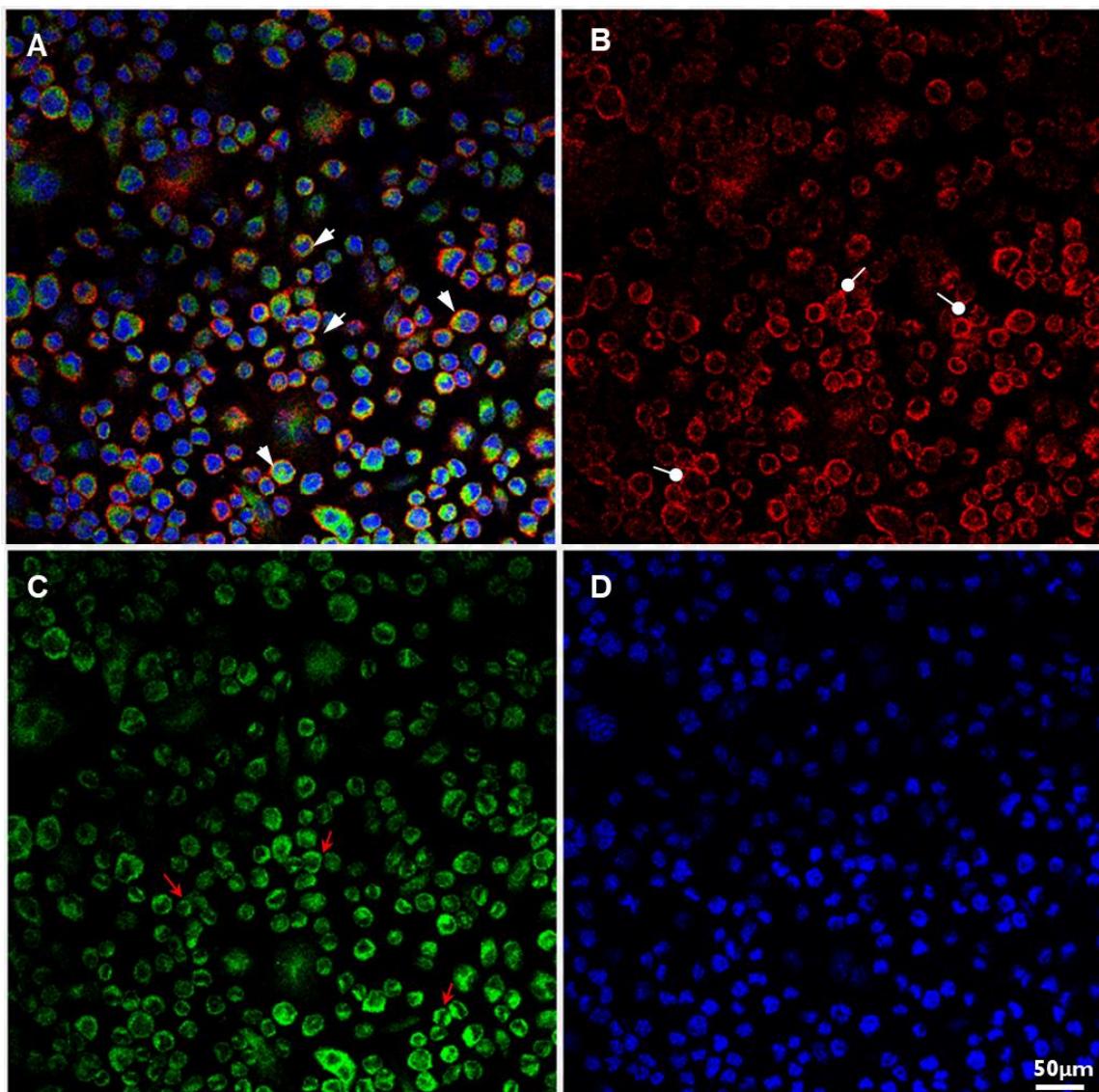


Figura 52: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados por 24 horas. Na imagem **A** é apresentada a sobreposição das imagens **B**, **C** e **D**, demonstrando pela indicação com cabeça de seta a colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho) em amarelo. A imagem **B** apresentada a marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular organizado é destacado pela indicação com a bola-seta. A imagem **C** apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização da Cx43 no citoplasma celular. A imagem **C** apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

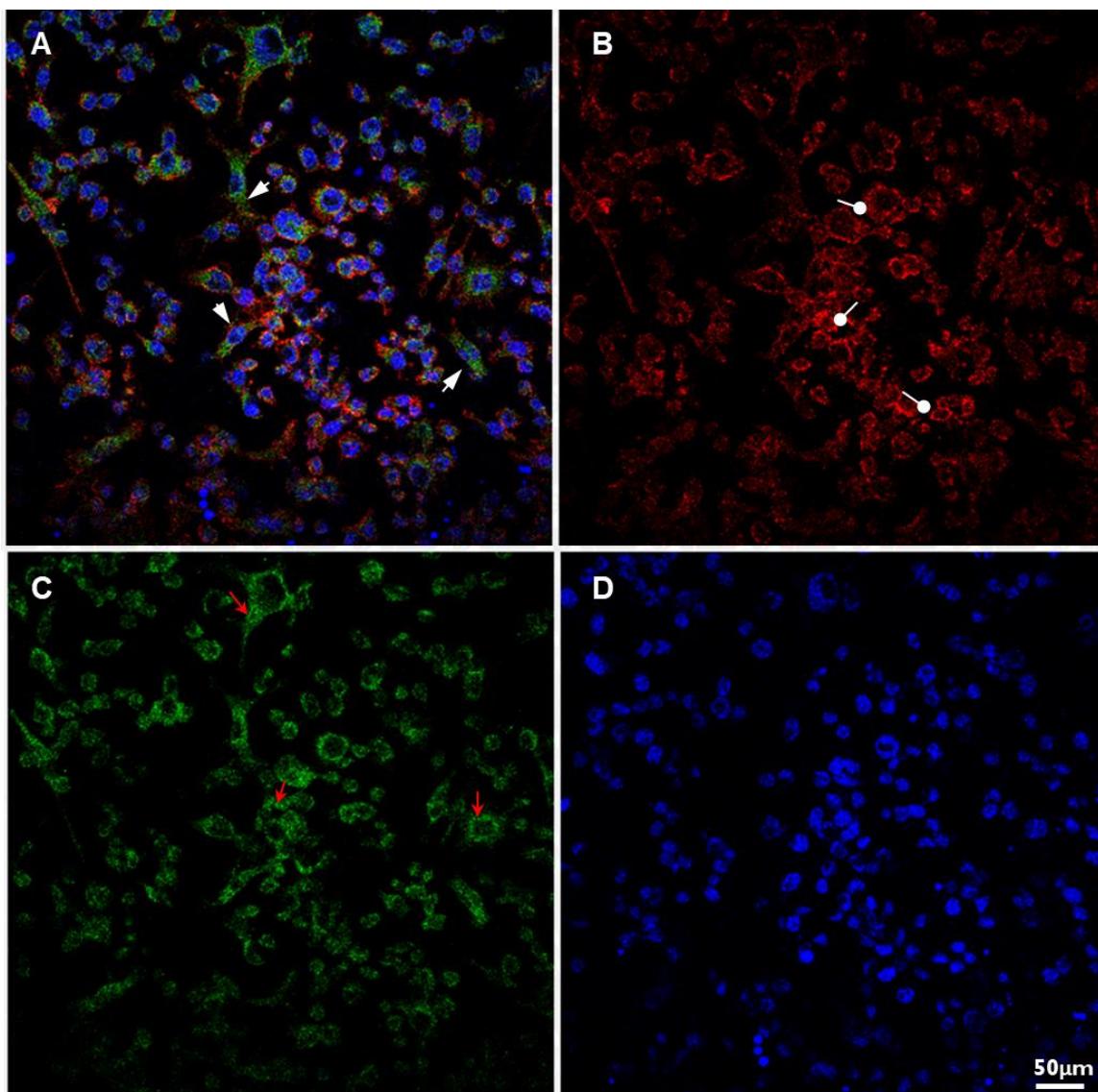


Figura 53: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados por 48 horas. Na imagem A é apresentada a sobreposição das imagens B, C e D, demonstrando a redução da colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho). A imagem B apresentada a marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular organizado é destacado pela indicação com a bola-seta. A imagem C apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização da Cx43 no citoplasma celular. A imagem C apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

As figuras 54, 55 e 56 representam os experimentos com as células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o *T. gondii* nos períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. A análise da linhagem celular infectada nos permitiu analisar possíveis modulações da Cx43 e do citoesqueleto celular na presença do parasita, de forma temporal e aguda, para comparação futura com experimentos utilizando os fatores pró-imuno inflamatórios associados.

A figura 54 mostra as marcações para a proteína Cx43 e para F-actina nas células J774-G8 infectadas com o *T. gondii* no período de 24 horas. A figura 54B indica uma sutil desorganização do citoesqueleto celular na presença do parasita, como é possível identificar pela marcação irregular para Faloidina (vermelho). Esta desorganização altera o transporte da Cx43 para membrana plasmática (figura 54C), como pode ser observado na marcação para Cx43 (verde), localizada em poucas áreas da membrana e concentrada no citoplasma de células infectadas. Na figura 54D observamos os núcleos marcados com o corante nuclear DAPI.

Na sobreposição de imagens (figura 54A) podemos observar pontos de colocalização da Cx43 com os filamentos de F-actina na membrana plasmática em células não infectadas, porém de forma reduzida.

Os experimentos utilizando a linhagem macrofágica J774-G8 infectada com o *T. gondii* no período de 48 horas estão destacados na figura 55. A marcação para Faloidina (vermelho), presente na figura 55B, indica uma ainda maior desorganização do citoesqueleto em células parasitadas, quando comparadas com as células infectadas por 24 horas. Esta desorganização, como descrito anteriormente, altera o transporte da Cx43 gerando uma redução considerável na inserção das junções comunicantes formadas por esta conexina (verde) na membrana plasmática das células infectadas (figura 55C). Esta alteração acaba por aumentar à concentração da Cx43 no citoplasma, dada à deficiência em seu ancoramento, uma vez que o citoesqueleto é essencial para o transporte de proteínas para a membrana plasmática.

Ainda, no mesmo campo analisado deste experimento, foi possível localizar células não infectadas e com a organização do citoesqueleto preservada, como demonstrado pela marcação em vermelho para F-actina (figura 55B). Nestas células, inclusive, foi possível identificar a manutenção da

marcação para Cx43 na membrana plasmática, apesar de ser clara a presença da marcação para esta proteína no citoplasma (figura 55C).

Diante destes resultados, a sobreposição de imagens destacada na figura 55A indicou vários pontos de colocalização da CX43 com os filamentos de F-actina na membrana plasmática das células não infectadas. Cabe ressaltar que estas células não apresentavam o seu citoesqueleto desorganizado, devido à ação parasitária identificada neste mesmo experimento, mostrando uma possível via de resposta ao microambiente da infecção. Na figura 55D são demonstrados os núcleos das células J774-G8, bem como os núcleos dos parasitas, ambos marcados o corante nuclear DAPI.

Estes resultados corroboram com o indicado por Rodjakovic, Salm e Beldi (2021), que indicaram em seu trabalho uma possível ligação da Cx43 com diversas vias de resposta macrofágica. Destaca-se, neste contexto, a interação dos macrófagos com células vizinhas, associada a: (1) resposta ao microambiente e o estímulo para migração de células do sistema imunológico para locais de inflamação; (2) apresentação de抗ígenos; e (3) a resposta ao caráter imunomodulatório do sistema. E, além disso, a modulação natural da Cx43 em processos patológicos como ocorre na AIDS, na sepse e nas parasitemias.

A figura 56 apresenta os experimentos de imunofluorescência realizados na linhagem macrofágica J774-G8 infectada com o *T. gondii* no período de 72 horas. Como observado nas células infectadas por 48 horas, há uma sensível diminuição da marcação para Cx43 na membrana plasmática das células infectadas (figura 56C), e que, por conseguinte também apresentam a desorganização do citoesqueleto (figura 56B). Porém, neste experimento de 72 horas de infecção a marcação para Cx43 na membrana plasmática das células não infectadas do microambiente está diminuída quando comparada com as culturas de células que se submeteram à infecção por 48 horas, mesmo com a manutenção da estrutura de citoesqueleto.

Na figura 56A, em que ocorre a sobreposição de imagens, não é observada a colocalização da CX43 com os filamentos de F-actina, uma vez que há uma severa desorganização do citoesqueleto em grande parte das células. Na figura 56 D observamos os núcleos marcados com o corante nuclear DAPI.

Estes resultados poderiam ser explicados por ATTIAS *et al.* (2020) e FUKUMOTO *et al.* (2021), que indicaram que o protozoário secreta proteínas da porção basal da troparia e implementando alterações no citoplasma da célula hospedeira. Dentre essas modificações, destaca-se a inibição da fusão dos lisossomos da célula hospedeira com a membrana do vacúolo parasitóforo (VP) e a redistribuição de outras organelas, incluindo as Mitocôndrias, o Retículo Endoplasmático (RE) e Complexo de Golgi (CG) para regiões próximas ao vacúolo.

Assim, ao compararmos a marcação das células controle (não infectadas e não tratadas) (figura 51), com as células infectadas (figuras 54, 55 e 56), observamos uma redução gradual da marcação de Cx43 na membrana plasmática, com pontos de localização desta proteína no citoplasma da célula. Esta alteração no posicionamento da Cx43, fora de seu local de atividade morfológica, acompanha a desorganização do citoesqueleto das células infectadas pelo protozoário. Por outro lado, a presença da Cx43 no citoplasma celular pode estar vinculada a tentativa de resposta celular ao ambiente infectado, porém a proteína não é posicionada na membrana plasmática da célula, devido o redirecionamento do CG para o VP e não apenas por conta da desorganização do citoesqueleto.

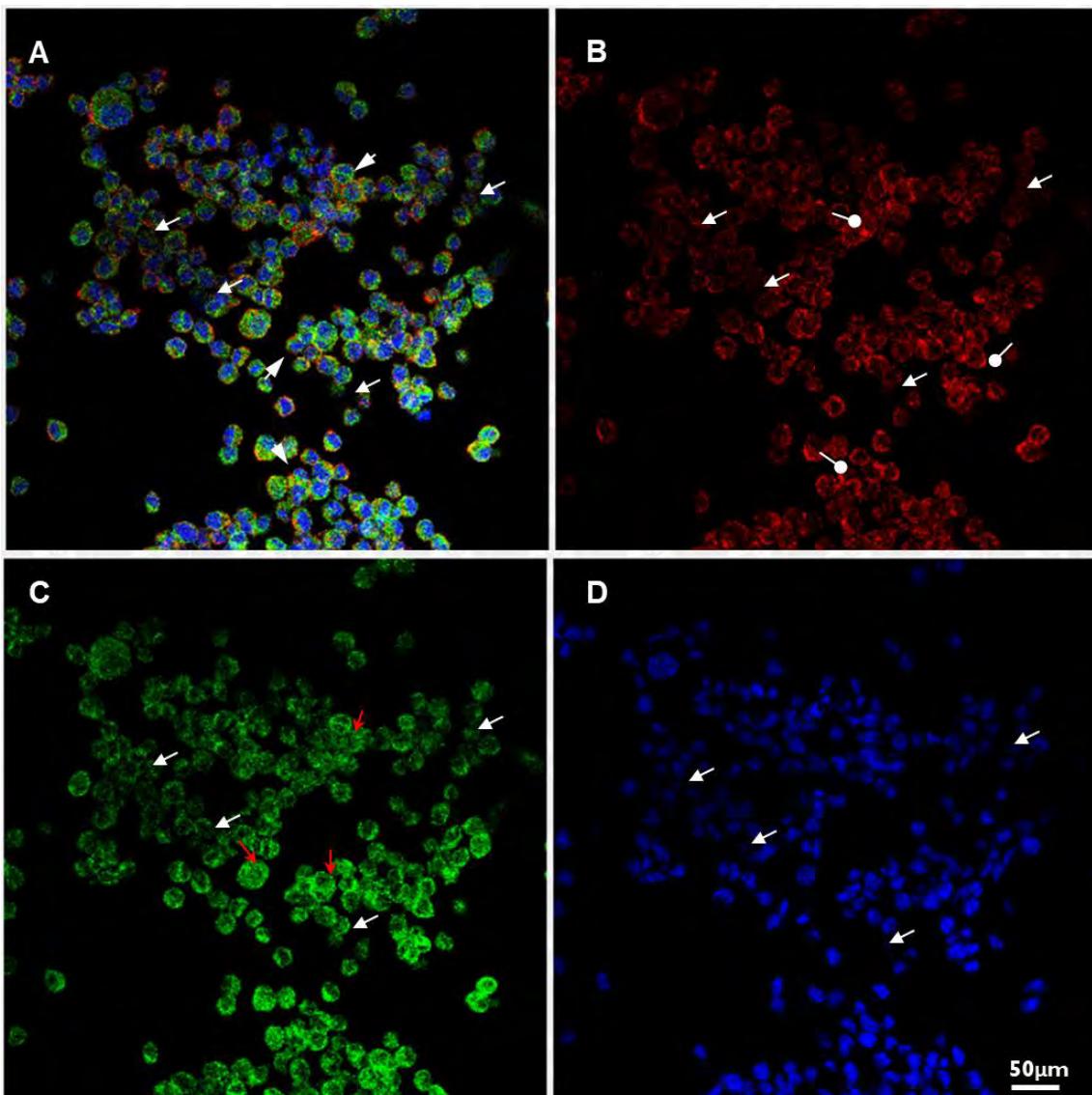


Figura 54: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com *T. gondii* no período de 24 horas. Na imagem **A** é apresentada a sobreposição das imagens **B**, **C** e **D**, demonstrando a redução da colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho). A seta branca indica a localização do parasita nas imagens. A imagem **B** apresentada a marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular é desorganizado pela presença do protozoário, destacado a marcação pela indicação com a bola-seta. A imagem **C** apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização da Cx43 no citoplasma celular. A imagem **C** apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

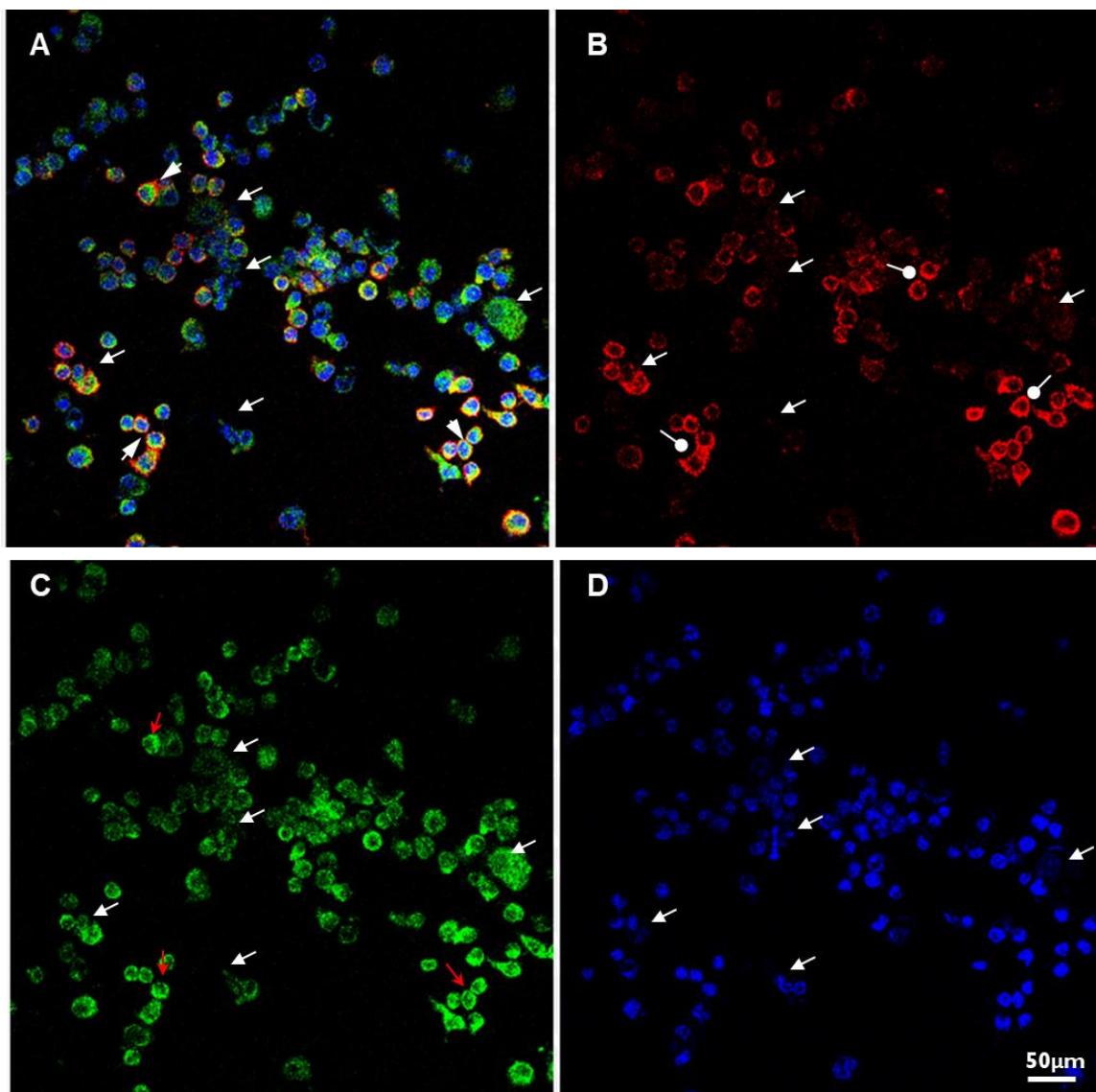


Figura 55: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com *T. gondii* no período de 48 horas. Na imagem A é apresentada a sobreposição das imagens B, C e D, demonstrando a colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho) em células não infectadas pelo protozoário. A seta branca indica a localização do parasita nas imagens. A imagem B apresentada a marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular é desorganizado pela presença do parazoário, destacado a marcação pela indicação com a bala-seta. A imagem C apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a redução da localização da Cx43 no citoplasma celular. A imagem C apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x

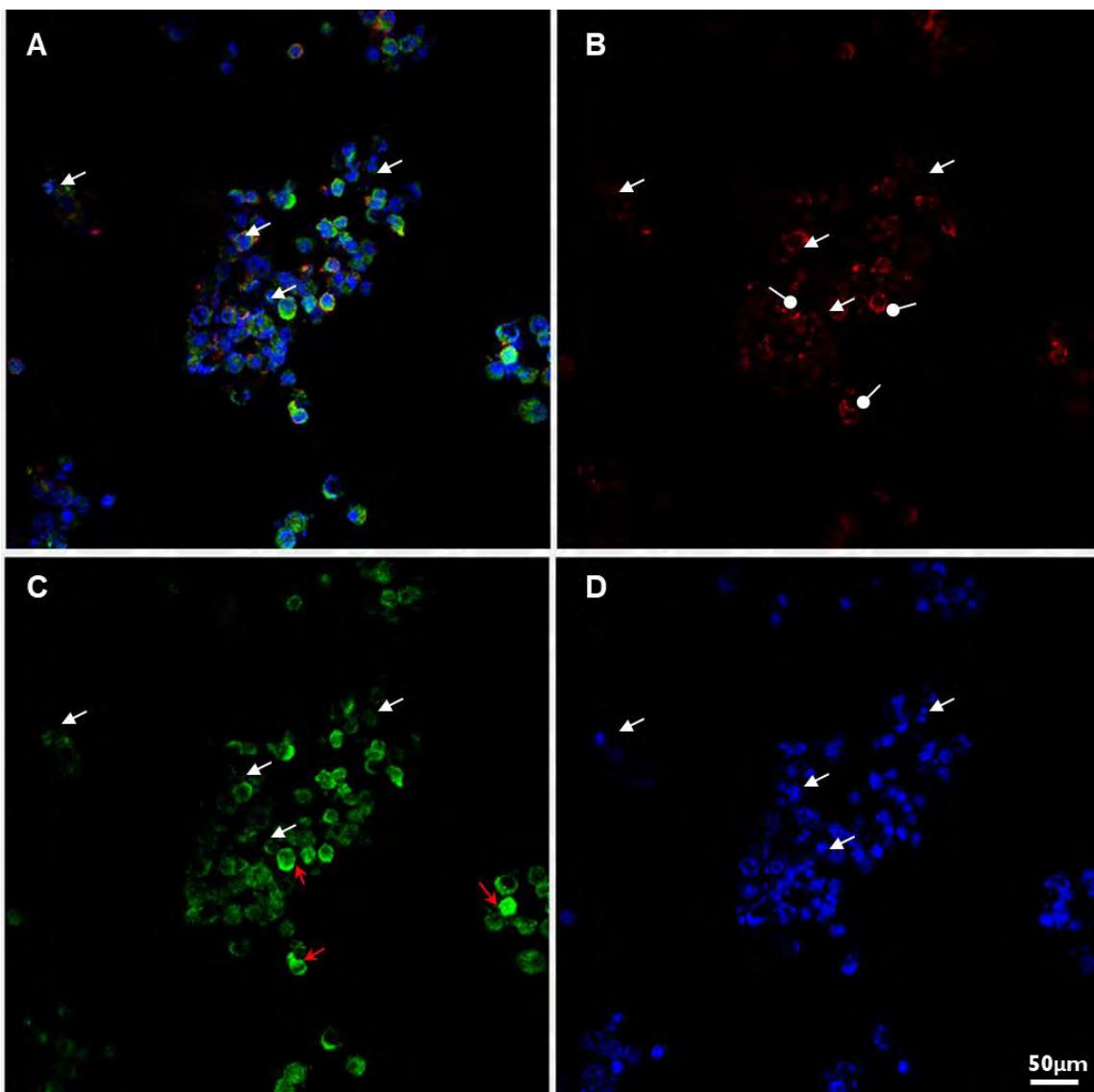


Figura 56: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com *T. gondii* no período de 72 horas. Na imagem A é apresentada a sobreposição das imagens B, C e D demonstrando a ausência de colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho). A seta branca indica a localização do parasita nas imagens. A imagem B apresentada a marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular está completamente desorganizado pela presença do protozoário, destacado pela indicação com a bola-seta. A imagem C apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a redução da localização da Cx43 no citoplasma celular. A imagem C apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x

As figuras 57, 58 e 59 representam os experimentos de imunofluorescência com as células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o *T. gondii* no período de 24 horas, passando pelo tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) nos períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

Na figura 57 é possível observar experimentos de imunofluorescência nas células da linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o *T. gondii* nos período de 24 horas, e tratamento com os fatores IFN- γ +TNF- α no período de 24 horas. A figura 57B representa a marcação para a proteína F-actina (Faloidina - vermelho), indicando a desorganização do citoesqueleto nas células infectadas pelo parasita. Esta desorganização, como já observado em experimentos anteriores, altera o transporte da Cx43 para membrana plasmática (figura 57C) (verde), mantendo a proteína concentrada no citoplasma de células infectadas.

Entretanto, o tratamento com os fatores combinados parece diminuir o grau de desorganização do citoesqueleto provocado pela infecção parasitária, o que se reflete em pontos de manutenção da marcação para Cx43 na membrana plasmática, bem como pontos de marcação para a mesma proteína no citoplasma celular. Na figura 57 D observamos os núcleos marcados com o corante nuclear DAPI.

Avaliando a figura 57A, podemos observar a sobreposição das micrografias, indicando pontos de colocalização entre a Cx43 e os filamentos de F-actina na membrana plasmática de células J774-G8 não infectadas (amarelo).

Os experimentos utilizando a linhagem macrofágica J774-G8 infectada com o *T. gondii* no período de 24 horas, tratada com IFN- γ +TNF- α no período de 48 horas, estão destacados na figura 58. A figura 58B representa a marcação para a proteína F-actina (Faloidina - vermelho), em que é possível observar uma considerável desorganização do citoesqueleto das células infectadas pelo parasita. Como já apresentando anteriormente, esta alteração de comportamento do citoesqueleto altera a inserção da Cx43 na membrana plasmática das células infectadas, como observado nas células da figura 58C, em que a proteína encontra-se dispersa no citoplasma e presente em alguns pontos da membrana. Porém, vale destacar que o tratamento combinado estimulou o aumento na produção de Cx43, mesmo não identificando a proteína

inserida na membrana. Na figura 58D observamos os núcleos marcados com o corante nuclear DAPI.

Analizando a figura 58A, podemos observar a sobreposição das imagens com pontos de colocalização da Cx43 com os filamentos de F-actina em locais pontuais da membrana nas células não infectadas (amarelo). O dano causado pela parasitemia na estrutura do citoesqueleto das células infectadas foi elevado, porém ocorreu o aumento da marcação para Cx43, ligado ao aumento da expressão destas proteínas nas células.

Por fim, a figura 59 mostra as imunomarcações nas células da linhagem macrofágica J774-G8, infectadas por 24 horas e tratadas com IFN- γ +TNF- α no período de 72 horas. A figura 59B representa a marcação para a proteína F-actina (Faloidina - vermelho), em que podemos identificar a completa desorganização do citoesqueleto nas células infectadas pelo parasita.

Porém, como observado nos experimentos com 24 e 48 horas de tratamento, foi identificada a marcação da Cx43 (verde) no citoplasma celular (figura 59C). Porém, mesmo sem a reversão do dano provocado pela parasitemia nas células após o tratamento das células com os fatores por 72 horas, conseguimos identificar a manutenção da marcação para a Cx43 no citoplasma das células J774-G8. Analisando sobreposição das imagens na figura 59A, não foi possível evidenciar a colocalização das proteínas Cx43 e F-actina, uma vez que houve um grave dano à estrutura de citoesqueleto.

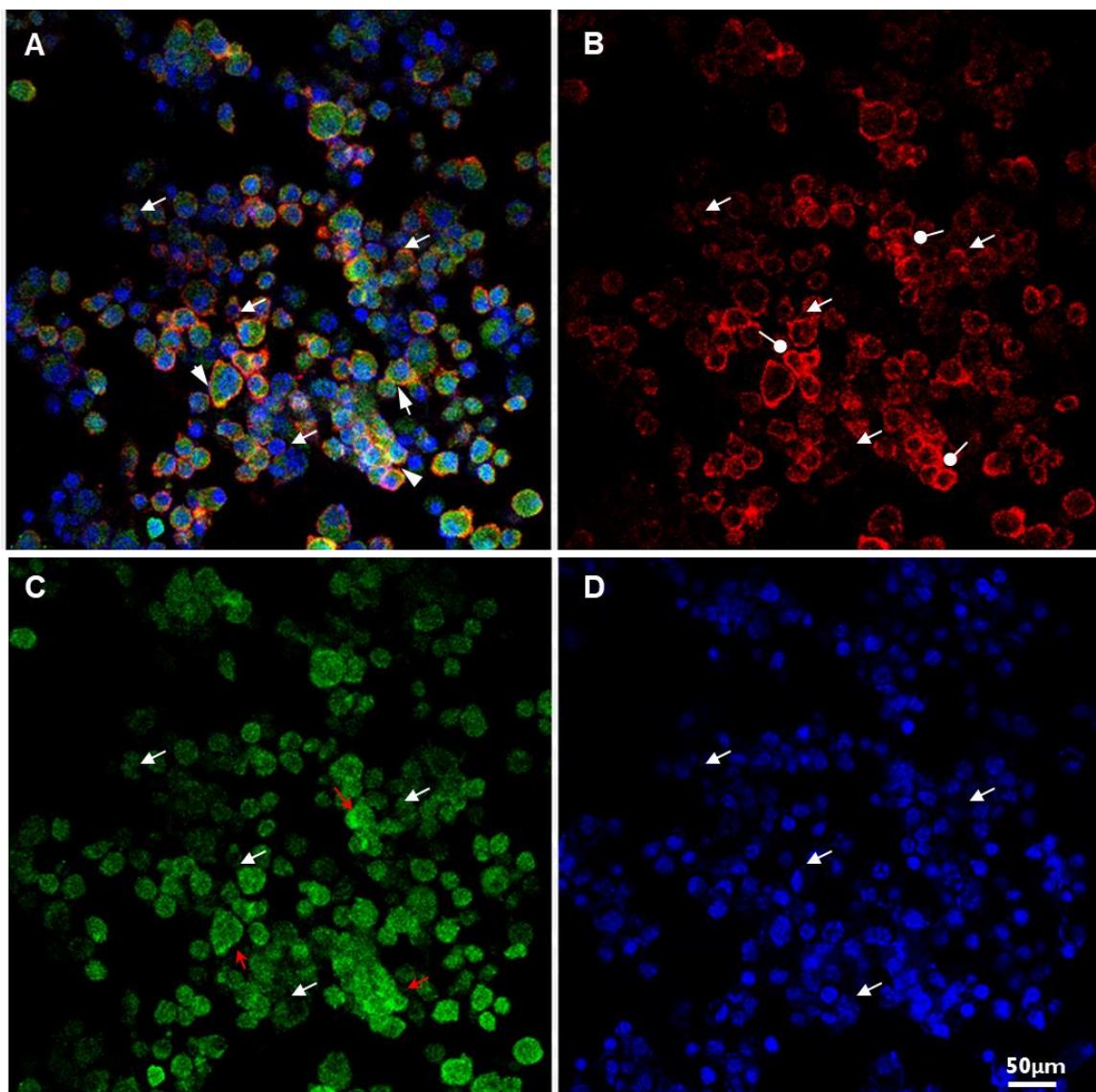


Figura 57: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com *T. gondii* no período de 24 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 24 horas. Na imagem **A** é apresentada a sobreposição das imagens **B**, **C** e **D**, demonstrando com a ponta de seta a colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho) em amarelo. A seta branca indica a localização do parasita nas imagens. A imagem **B** apresentada a marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular é desorganizado pela presença do protozoário, destacado a marcação com a bola-seta. A imagem **C** apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização da Cx43 em pontos da membrana plasmática e do citoplasma celular. A imagem **C** apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

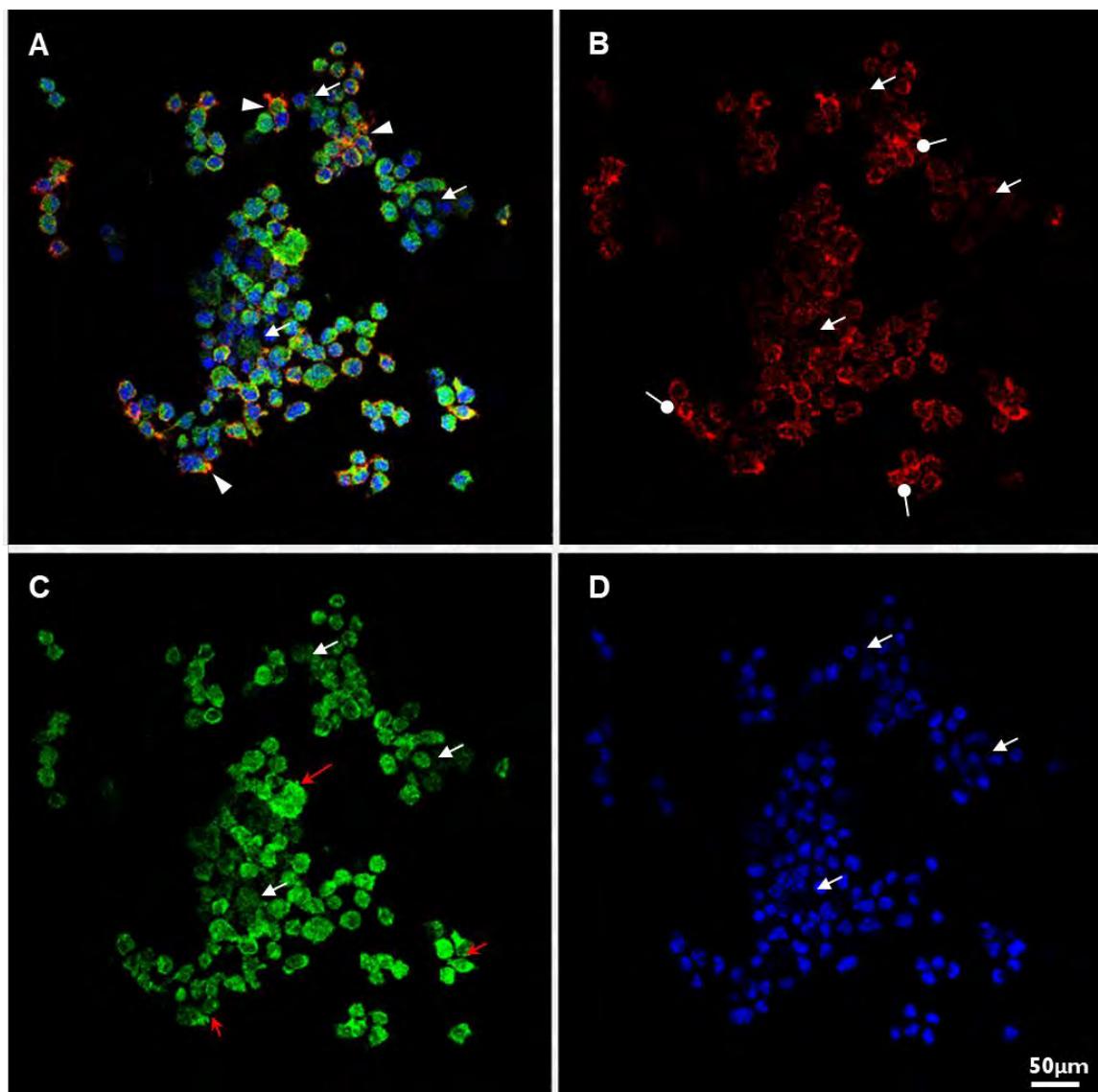


Figura 58: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com *T. gondii* no período de 24 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 48 horas. Na imagem A é apresentada a sobreposição das imagens B, C e D, demonstrando com a ponta de seta as pontuais colocalizações entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho) em amarelo. A seta branca indica a localização do parasita nas imagens. A imagem B apresentada a marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular apresenta uma considerável desorganização pela presença do protozoário, destacado a marcação pela indicação com a bola-seta. A imagem C apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização da Cx43 em pontos da membrana plasmática e do citoplasma celular. A imagem C apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

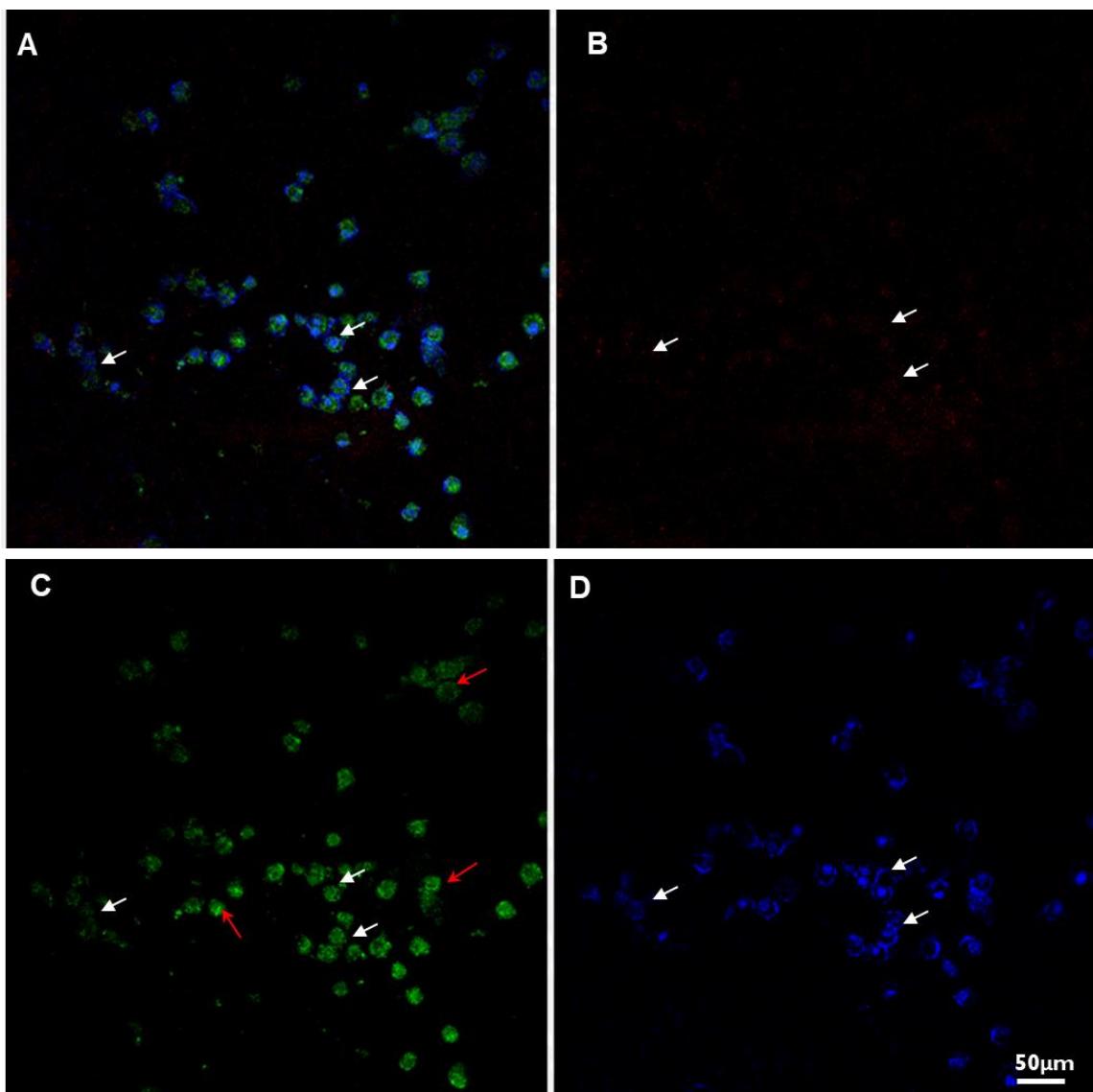


Figura 59: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com *T. gondii* no período de 24 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 72 horas. Na imagem **A** é apresentada a sobreposição das imagens **B**, **C** e **D**, demonstrando a ausência de colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho). A seta branca indica a localização do parasita nas imagens. A imagem **B** apresentada a marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular apresenta uma completa desorganização pela presença do protozoário. A imagem **C** apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização da Cx43 no citoplasma celular. A imagem **C** apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

As figuras 60, 61 e 62 representam os experimentos de imunofluorescência com as células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o *T. gondii* no período de 48 horas, passando pelo tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) nos períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

A figura 60 representa os resultados de imunofluorescência em células da linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o *T. gondii* no período de 48 horas, tratadas com os fatores IFN- γ +TNF- α combinados, no período de 24 horas. A figura 60B representa a marcação da Faloidina (vermelho), em que é possível observar a desorganização do citoesqueleto nas células infectadas pelo parasita. Com a desorganização do citoesqueleto, houve a alteração do transporte da Cx43 para membrana plasmática (figura 60C), que se manteve no citoplasma das células infectadas. Na figura 60D observamos os núcleos marcados com o corante nuclear DAPI. Analisando sobreposição das imagens na figura 60A, não foi possível evidenciar a colocalização das proteínas Cx43 e F-actina, uma vez que houve um grave dano à estrutura de citoesqueleto.

As figuras 61 e 62 mostram os experimentos de imunofluorescência em células da linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o *T. gondii* por 48 horas, sendo estas tratadas com os fatores combinados IFN- γ +TNF- α nos períodos de 48 e 72 horas, respectivamente.

Nas figuras 61B e 62B é possível observar a marcação da Faloidina (vermelho), mostrando a completa ausência de marcação para F-actina no citoesqueleto das células infectadas. Dada à ausência de estruturas de citoesqueleto formadas por F-actina, não houve o direcionamento da proteína Cx43 (em verde) para a membrana plasmática das células, ficando esta retida pontualmente no citoplasma (figuras 61C e 62C). Nas figuras 61D e 62D observamos os núcleos marcados com o corante nuclear DAPI.

Dada a ausência de marcação do citoesqueleto a partir da identificação da proteína F-actina nas figuras 61B e 62B, causada pelo dano provocado pela parasitemia gerada pelo *T. gondii*, não ocorreu a formação de pontos de colocalização entre a Cx43 e a F-actina.

Por fim, na figura 63 é possível observar os experimentos de imunofluorescência realizados com células J774-G8 infectadas com *T. gondii* por 72 horas, e tratadas com os fatores IFN- γ +TNF- α por 48 horas. A figura 63B

representa a marcação da Faloidina (vermelho), é possível observar a ausência de marcação de F-actina, o que indica a completa desorganização do citoesqueleto nas células infectadas pelo parasita. Porém, apesar desta desorganização, existe a marcação da proteína Cx43 (verde) no citoplasma celular (figura 63C).

Consequentemente na figura 63A não foi possível identificar locais em que tenha ocorrido colocalizações, haja vista que não houve marcação para a proteína F-actina. Na figura 63D são demonstrados os núcleos marcados com o corante nuclear DAPI.

Porém, mesmo tendo identificado que o tratamento com os fatores combinados não reverteu o dano ao citoesqueleto das células macrofágicas, foi possível inferir que a produção da proteína Cx43 se manteve podendo este resultado estar intimamente associado aos mecanismos de regulação promovidos pelos fatores pró-imuno inflamatórios IFN- γ +TNF- α .

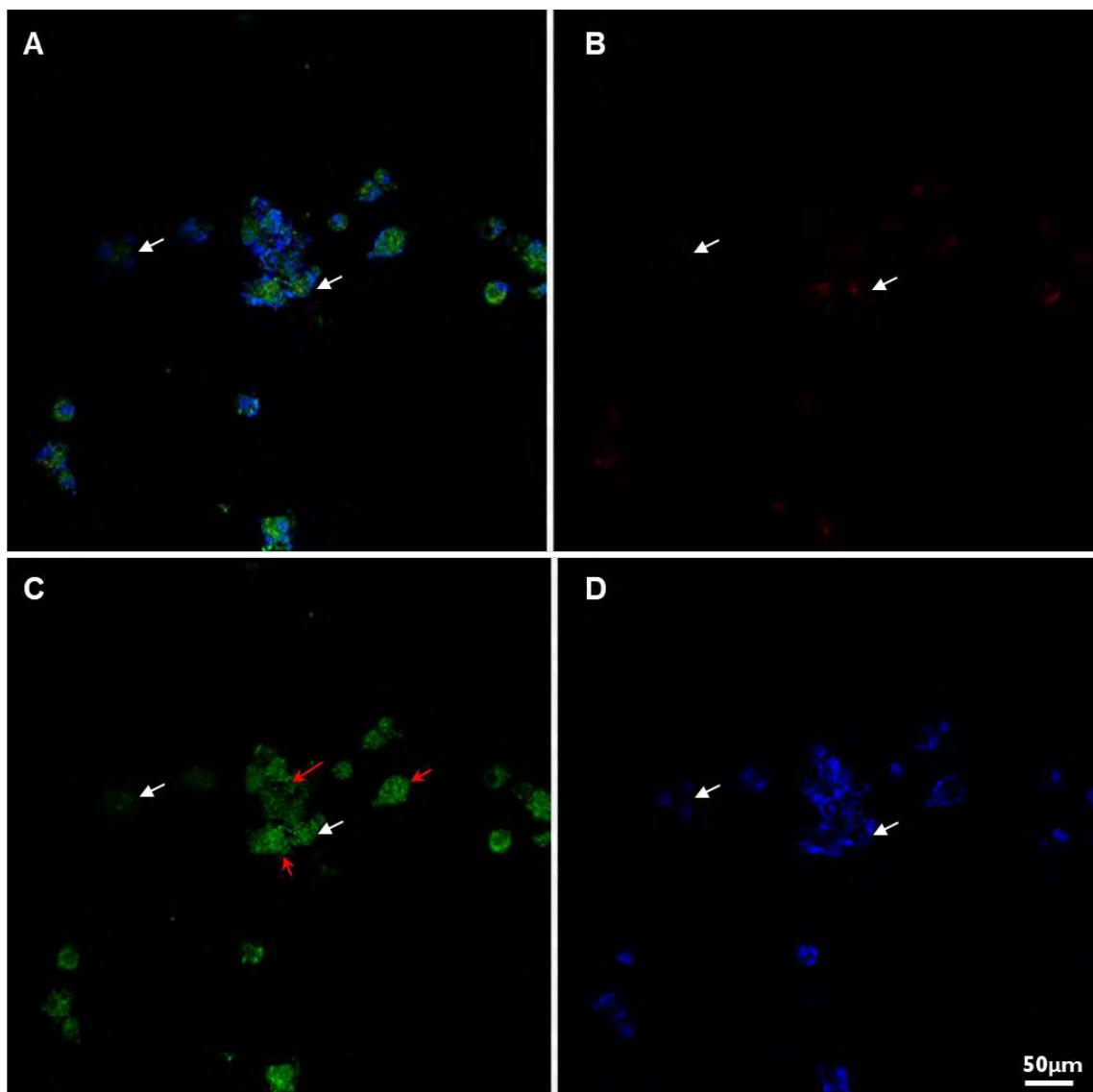


Figura 60: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com *T. gondii* no período de 48 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 24 horas. Na imagem **A** é apresentada a sobreposição das imagens **B**, **C** e **D**, demonstrando a ausência de colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho). A seta branca indica a localização do parasita nas imagens. A imagem **B** apresentada a ausência de marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular é completamente desorganizado pela presença do protozoário. A imagem **C** apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização da Cx43 no citoplasma celular. A imagem **C** apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

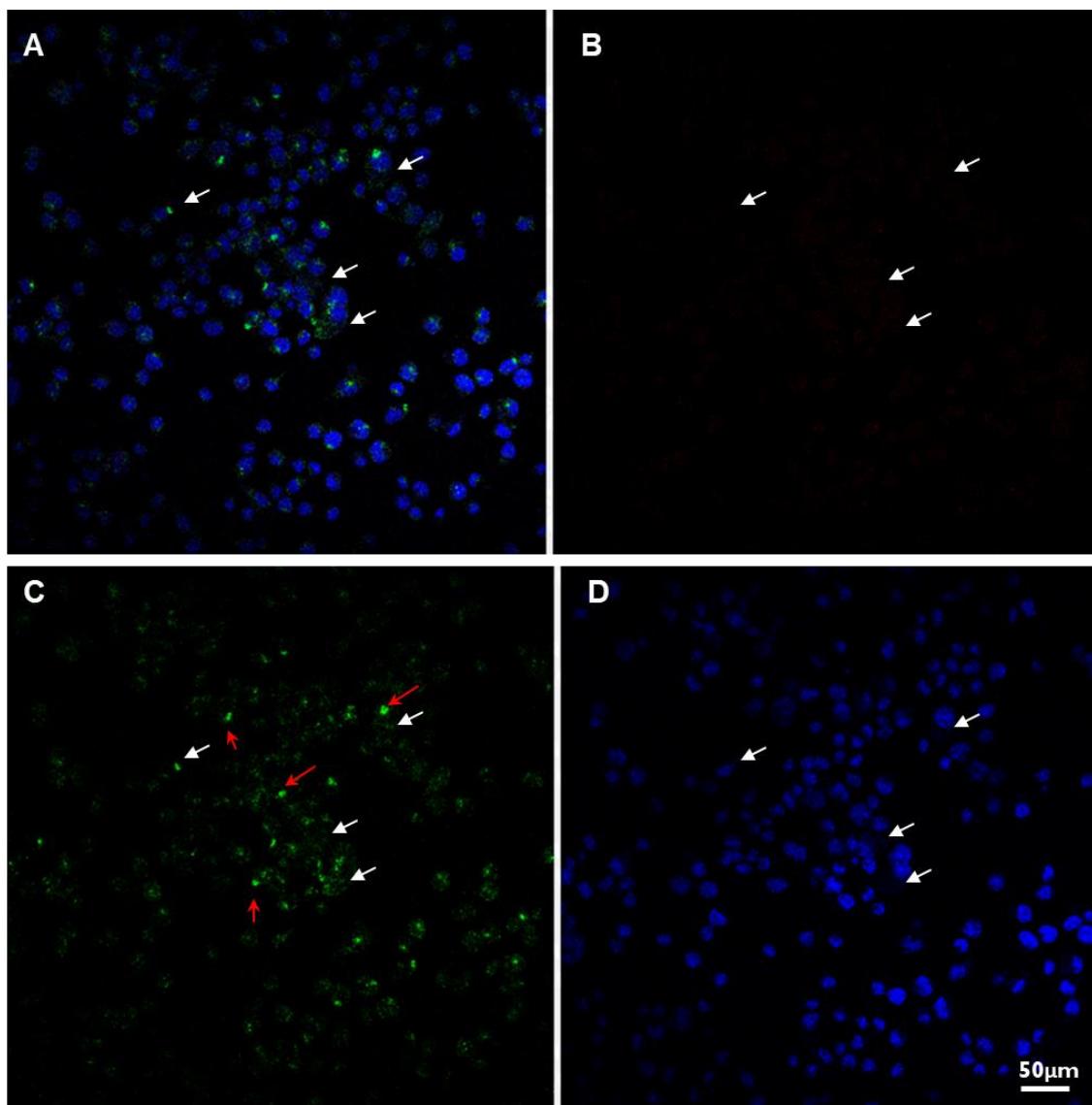


Figura 61: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com *T. gondii* no período de 48 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 48 horas. Na imagem **A** é apresentada a sobreposição das imagens **B**, **C** e **D**, demonstrando a ausência de colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho). A seta branca indica a localização do parasita nas imagens. A imagem **B** apresentada a ausência de marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular é completamente desorganizado pela presença do protozoário. A imagem **C** apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização pontual da Cx43 no citoplasma celular. A imagem **C** apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

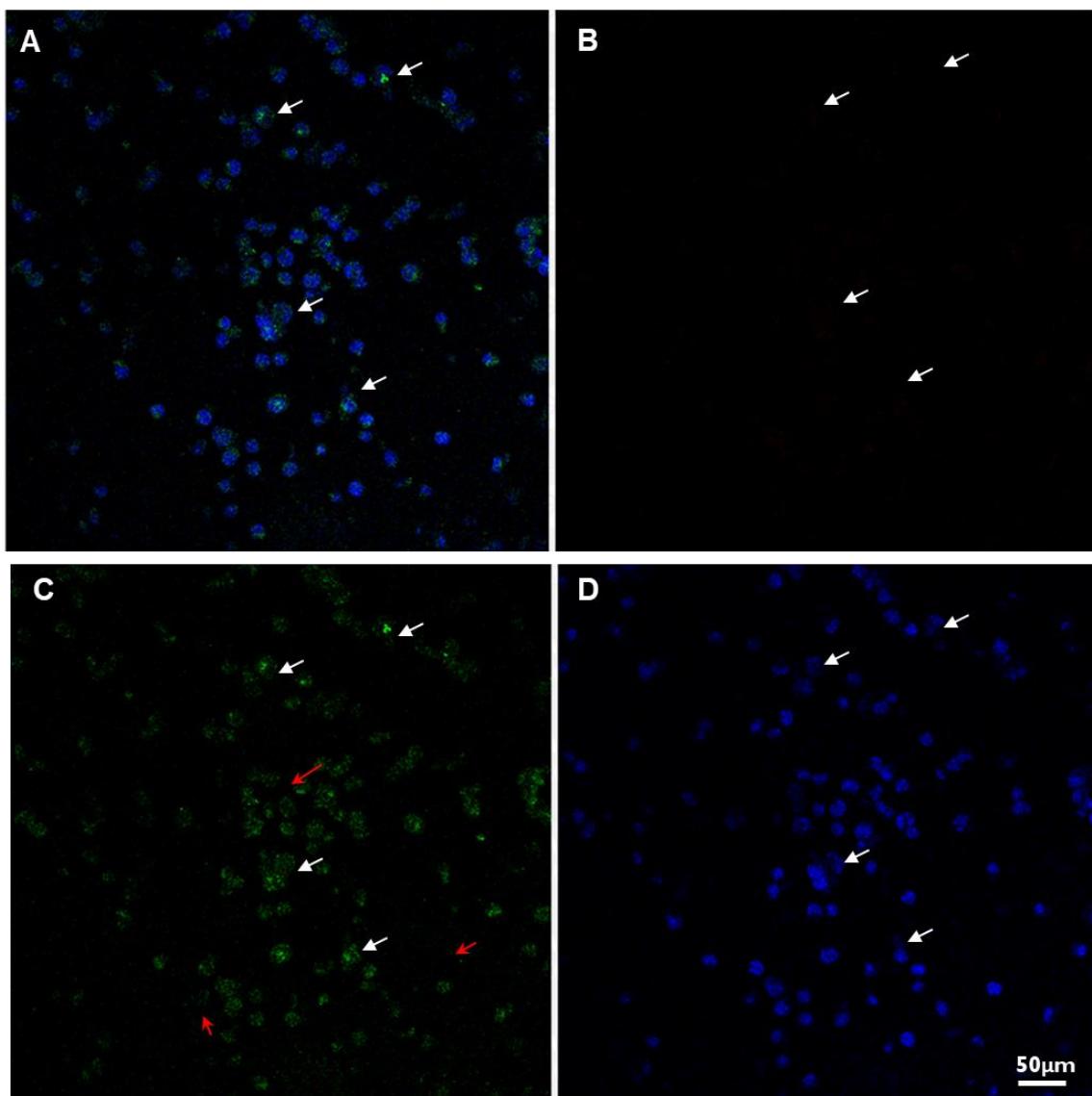


Figura 62: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com *T. gondii* no período de 48 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 72 horas. Na imagem **A** é apresentada a sobreposição das imagens **B**, **C** e **D**, demonstrando a ausência de colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho). A seta branca indica a localização do parasita nas imagens. A imagem **B** apresentada a ausência de marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular é completamente desorganizado pela presença do protozoário. A imagem **C** apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização pontual da Cx43 no citoplasma celular. A imagem **C** apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

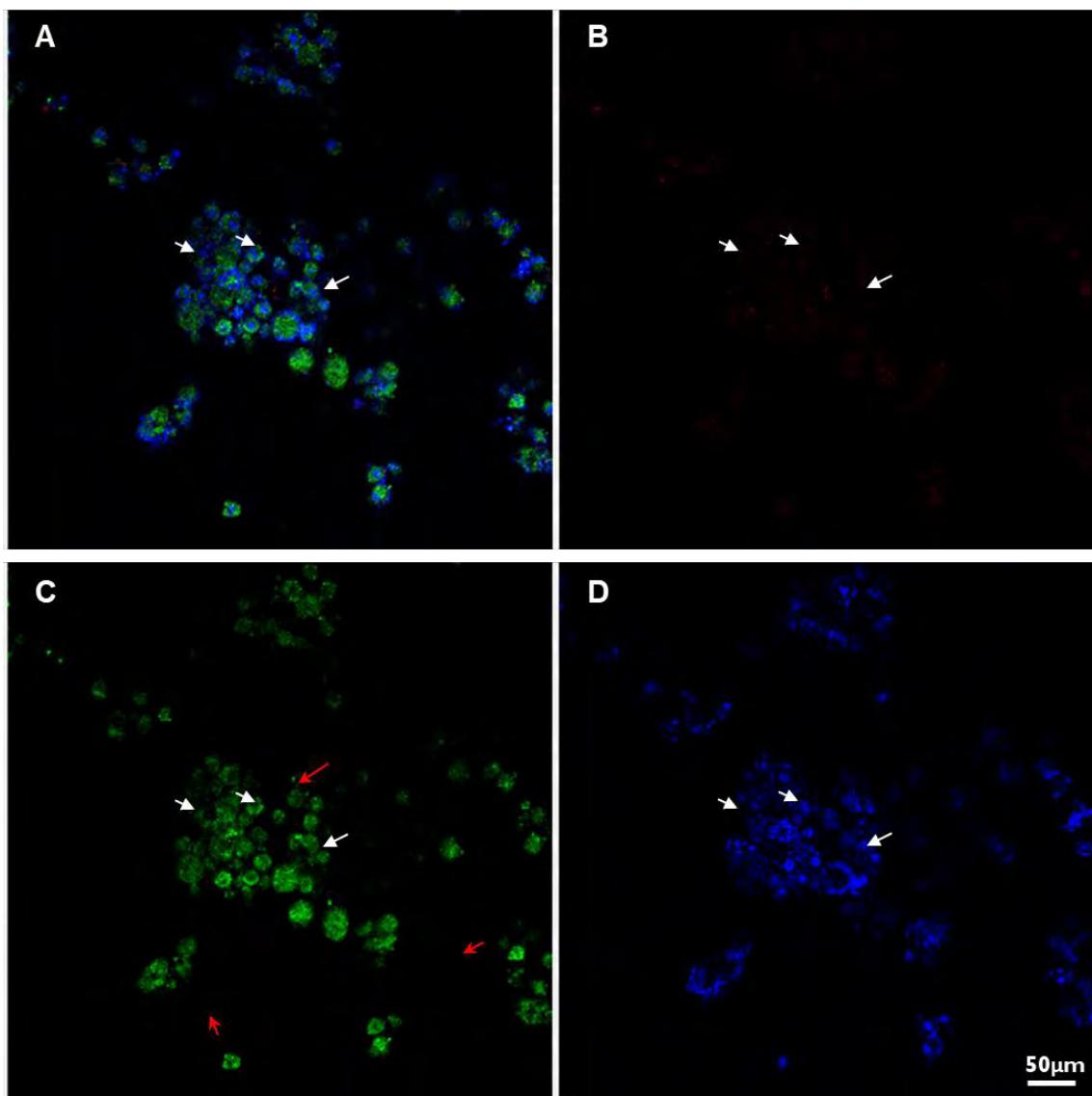


Figura 63: Imagem de imunofluorescência demonstrada em Microscopia Confocal da cultura de Linhagem Celular Macrofágica J774-G8 infectada com *T. gondii* no período de 72 horas tratada com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) por 48 horas. Na imagem **A** é apresentada a sobreposição das imagens **B**, **C** e **D**, demonstrando a ausência de colocalização entre a marcação para a Cx43 (verde) e a F-actina (vermelho). A seta branca indica a localização do parasita nas imagens. A imagem **B** apresentada a ausência de marcação para os filamentos de F-actina pela Faloidina. O citoesqueleto celular é completamente desorganizado pela presença do protozoário. A imagem **C** apresenta a marcação específica para Cx43. É destacado pela seta vermelha a localização da Cx43 no citoplasma celular. A imagem **C** apresenta a marcação para o núcleo celular pelo DAPI (azul). Objetiva de 40x.

6. DISCUSSÃO

6.1. CRESCIMENTO CELULAR E ASPECTOS MORFOLÓGICOS: DA INFECÇÃO AO TRATAMENTO

As infecções parasitárias são um problema de saúde pública de abrangência global (TALABANI *et al.*, 2010). Dentre estas infecções, podemos destacar a Toxoplasmose, que faz parte do grupo de infecções parasitárias mais comuns ao homem e a outros animais homeotérmicos, sendo mais de 30 espécies de aves e 300 de mamíferos que já tiveram a sua infecção comprovada (LÜDERA *et al.*, 2001; PORTES *et al.*, 2023).

Toxoplasma gondii é o protozoário causador da toxoplasmose, de caráter intracelular obrigatório capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves, incluindo o homem (DUBEY; LINDSAY e SPEER, 1998; ATTIAS *et al.*, 2020). Sua capacidade de induzir infecções duradouras em animais de sangue frio ainda não está clara, tendo como fonte mais provável de infecção o consumo de carne contendo cistos teciduais ou pela ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos (FERREIRA *et al.*, 2020).

Desta forma, o *T. gondii* é um dos parasitas mais estudados por sua importância médica e veterinária (DUBEY, 2008).

O protozoário intracelular obrigatório *T. gondii* possui diversas estratégias para contornar ou manipular com sucesso o sistema imunológico e estabelecer uma infecção crônica (LIMAE e LODOEN, 2019).

Desta forma, em nosso trabalho, procuramos estudar não só as alterações relacionadas com crescimento celular e os aspectos morfológicos associados aos macrófagos (Linhagem Celular J774-G8), infectados com o *Toxoplasma gondii*, como também analisar o comportamento das junções comunicantes, a partir da modulação da expressão proteica da conexina (Cx43), e do citoesqueleto celular em ambientes de infecção com este parasita. Ainda, neste contexto, estes aspectos foram analisados a partir de tratamentos com os fatores pró-imuno inflamatórios Interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) de forma isolada, ou de forma combinada (IFN- γ +TNF- α).

Assim, seria possível analisar um possível perfil de modulação da comunicação juncional em um microambiente de infecção aguda gerado pelo parasita *T. gondii* após o tratamento com os fatores.

A partir de nossos resultados iniciais foi possível observar uma severa diminuição no crescimento e na sobrevivência celular das células J774-G8 ao longo do processo de infecção (24, 48 e 72 horas) (figuras 28 A2, B2 e C2), associada à manutenção da sobrevida do parasita no meio intracelular, quando comparadas com as células J774-G8 controle (não-infectadas). Esta descrição permite a comparação do comportamento celular após o tratamento com os fatores pro imune inflamatórios.

Tais alterações corroboram com os resultados De Carvalho *et al.* (2021), demonstrando a diminuição do número de células viáveis no microambiente celular devido à manutenção da sobrevivência do parasita *in vitro* no modelo agudo de infecção.

Complementando estes dados, o trabalho publicado por Attias *et al.* (2020) afirmou que a interação do *T. gondii* com a célula do hospedeiro visa sua internalização, e esse processo pode ocorrer em qualquer célula nucleada, principalmente macrófagos, células epiteliais, células musculares e neurônios.

Estas alterações estão relacionadas com os achados associados à indução de alterações em vias bioquímicas e estruturais celulares promovidos pelo parasita, para que o mesmo mantenha a sua sobrevida.

Uma destas ações está associada à inibição da produção de Óxido Nítrico em macrófagos peritoneais e em linhagem macrofágica J774-A1, após a infecção com *T. gondii* (SEABRA *et al.*, 2004; PADRÃO *et al.*, 2014), o que desativa sua capacidade microbicida de destruição do patógeno. Lüder *et al.* (2017) demonstrou que o *T. gondii* possui a capacidade de inibir a ativação de macrófagos.

Este processo de evasão do sistema imunológico foi novamente abordado por Lima e Lodoen (2019), destacando que o *T. gondii* manipula a imunidade do hospedeiro por meio do controle da transcrição do gene e da desregulação das vias de sinalização que resultam na modulação da adesão e migração celular, assim como na modulação da liberação de citocinas imunorreguladoras e apoptose.

Nas micrografias de maior aumento percebemos a formação de grumos celulares e o desprendimento das células da garrafa de cultivo, associadas com alterações morfológicas causadas pelo aumento da parasitemia e consequentemente da interação parasito-célula provocando assim a diminuição na quantidade de células viáveis em cultura (figuras 28A2, B2 e C2).

Estes dados podem ser justificados pela multiplicação assexuada do *T. gondii* por endodiogenia no interior da célula hospedeira, dando origem a inúmeras células-filhas (DUBEY *et al.*, 1998; DE SOUSA *et al.*, 2010; ATTIAS *et al.*, 2020), o que esclarece o aumento gradual da parasitemia com o decorrer do tempo de infecção.

Portanto, no presente trabalho, aprofundamos os estudos relacionados à comunicação juncional utilizando as células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o *T. gondii*, e que tiveram início em estudos do nosso grupo em 2015, abordando a resposta celular ao tratamento com fatores pró-imuno inflamatórios.

Vale ressaltar que todo o estudo foi conduzido com células de linhagem, haja vista que estas células reproduzem funcionalmente as atividades praticadas por macrófagos obtidos *in vivo*, principalmente no que tange a expressão e funcionalidade das conexinas (Cx43), como já descrito por Fortes *et.al.* (2004).

A fim de avaliar se o tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios IFN- γ , TNF- α e IFN- γ + TNF- α reverteriam os danos morfológicos da cultura infectada com o *T. gondii*, foram realizados experimentos para a obtenção de micrografias de contraste de fase que permitiram acompanhar as características morfológicas da cultura submetida ao tratamento.

Porém, antes fazer os tratamentos com as células infectadas, utilizamos os fatores em células controle, para que pudéssemos analisar possíveis alterações celulares somente com a ativação pelos fatores. Diante disso, de nossos resultados demonstraram que as células tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios, isolados ou combinados, não apresentaram alterações morfológicas e estruturais, mantendo o crescimento celular uniforme quando comparadas com a célula controle (não infectada e sem tratamento) (Figura 29).

O comportamento das células macrofágicas J774-G8 infectadas com o *Toxoplasma gondii* no microambiente de estímulo inflamatório foi analisado nos experimentos das figuras 30, 31 e 32. Nesta sequência as células J774-G8

estavam infectadas por 24 horas, e foram tratadas por 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Estes resultados apontaram para uma melhora no microambiente celular quando comparadas com a cultura de células infectadas não tratadas, ou seja, com a manutenção do crescimento e da viabilidade celular, como demonstrado nas micrografias de contraste de fase.

As células macrofágicas J774-G8 infectadas com o *T. gondii* por 48 horas e tratadas por 24, 48 e 72 horas, respectivamente, foram analisadas nos experimentos das figuras 33, 34 e 35. Estas também apresentaram a melhora na morfologia celular, porém com o aumento na formação de agrupamentos celulares, denominados em nosso trabalho de Grumos Celulares.

Do mesmo modo, as células macrofágicas J774-G8 infectadas com o *T. gondii* por 72 horas e tratadas por 24, 48 e 72 horas, respectivamente, foram analisadas nos experimentos das figuras 36, 37 e 37. Entretanto, por conta do tempo de exposição à parasitemia, foi identificado um conjunto de danos celulares elevados, que acabaram por não contribuir para uma melhora significativa na morfologia celular e no aumento do número de grumos celulares, que foi menor quando comparado com o observado nas células tratadas por 48 horas, mas expressivo quando comparado com a cultura infectada sem tratamento.

Todavia, destaca-se a formação de grumos celulares em todos os tratamentos (individuais ou combinados). Este dado pode nos sugerir que a organização celular em grumos deva indicar uma maior necessidade de troca de informações, entre as células, uma vez que o ambiente está sendo ativado por citocinas como o TNF- α , importantes para a ativação de macrófagos na resposta imunológica inata e consequente para aumento da capacidade celular em apresentação de抗ígenos aos linfócitos T CD4 $^{+}$, responsáveis pela produção de IFN- γ capaz de retroalimentar a ativação macrofágica (Langston *et al.* 2017; ABBAS, 2011; ADANS & HAMILTON, 1984).

Ao avaliar os tratamentos de forma individual, os dados nos demonstraram que de forma combinada (TNF- α + IFN- γ) os fatores pró-imuno inflamatórios são capazes de induzir uma reorganização do arranjo das células em cultura. Este fato pode ser corroborado com os gráficos presentes nas figuras 44 e 45, que indicam uma formação abrupta de grumos celulares em todos os horários de

incubação, em relação às células infectadas sem tratamento. Este indicativo se alinha com a descrição da ativação macrofágica clássica, originalmente relatada como dependente da ação do IFN- γ e do TNF- α (GORDON, 2007).

Além disso, estes dados corroboram 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 possam adquirir a capacidade de realizar funções complexas de destruição e apresentação de抗ígenos (ADANS & HAMILTON, 1984; SCHAIBLE et al., 1999, MOSSER e EDWARDS, 2008; TA, CHAWLA e POLLARD 2013; SELDERS et al., 2017).

Após a etapa de análise do crescimento celular e do perfil morfológico, os experimentos foram limitados apenas à utilização dos fatores combinados devido a melhor resposta celular neste tratamento. Posteriormente foi realizada a análise da expressão da proteína conexina 43 (Cx43) por *Western blot*, a fim de avaliar a sua modulação após o tratamento com os fatores combinados em células macrofágicas.

6.2. EXPRESSÃO PROTEICA DA Cx43: INFECÇÃO x TRATAMENTO

A expressão dos níveis proteicos da conexina43 foi analisada através de ensaios de imunoelétrotransferência utilizando células J774-G8 em 4 situações distintas.

No primeiro conjunto de experimentos (figura 46), estudamos as células J774-G8 nas condições experimentais de: (1) *Controle* (não infectadas); (2) *Infectadas* com o *Toxoplasma gondii* na proporção de 10 parasitas para uma célula; e (3) *Não infectadas e tratadas* com os fatores combinados por 24, 48 e 72 horas. Após, foi realizado o segundo conjunto de experimentos em que utilizamos células J774-G8 *Infectadas e tratadas* com os fatores combinados e nos horários de 24, 48 e 72 horas (figura 49).

A partir dos resultados apresentados na figura 46A, pudemos identificar que a Cx43 foi expressa tanto nas células controle, como também nas células infectadas (sem tratamento), em todos os tempos, e tratadas (sem infecção) em todos os tempos de incubação analisados no experimento (24, 48 e 72 horas).

As bandas com material proteico das células infectadas não apresentaram alterações significativas na expressão da proteína Cx43, quando

comparadas com os resultados relacionados às células controle não infectadas. Entretanto, ao analisar as bandas que representam a expressão da Cx43 nas células J774-G8 (não infectadas) tratadas com os fatores combinados é identificado um significativo aumento na expressão da proteína no horário de 72 horas de incubação com os fatores combinados (figura 46). Os dados densitométricos confirmaram os achados visíveis representados na membrana marcada com o anticorpo (figura 47A e 47B).

Vale destacar que a funcionalidade das junções comunicantes de células da linhagem macrofágica J774-A1 tratadas previamente com meio condicionado (adquirido de ambiente lesões inflamatórias) foi avaliada por Saez *et al.* (2000) através do experimento de microinjeção de corante, que demonstrou acoplamento celular através do experimento. Eugenin *et al.* (2001) também demonstraram que as junções comunicantes formadas por Cx43 estavam presentes e funcionais em células da micróglia ativadas com IFN- γ + TNF- α e IFN- γ + LPS.

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

Estes resultados corroboram com o trabalho publicado por Shen *et al.* (2018) e Rodjakovic, Salm e Beldi (2021), estabelecendo a ligação da Cx43 presente em macrófagos com diversas vias de resposta imunomoduladas, dentre elas destaca-se a comunicação com as células vizinhas do tecido lesionado, a liberação de mediadores inflamatórios em resposta ao microambiente, o estímulo para migração de células do sistema imunológico para locais de inflamação, a apresentação de抗ígenos, e a modulação da Cx43 em processos patológicos que envolvam a AIDS, a sepse e as parasitemias.

Ao realizarmos os experimentos de *Western blot* na linhagem celular J774-G8 infectada com *T. gondii* por 24 horas, e que foi tratada com os fatores combinados nos horários de 24, 48 e 72 horas, observamos um aumento gradual da expressão de Cx43 nos horários de tratamento (Figura 49). A avaliação da densitometria destaca este aumento com diferença estatística significativa entre as variáveis. Entretanto, ao comparar a expressão da proteína Cx43 nas células infectadas (não tratadas) por 24 horas, com as células infectadas por 24 horas,

e tratadas pelo mesmo período, foi observada uma queda na expressão da proteína Cx43 (Figura 50 A).

Estes achados apoiam a linha de que a ativação macrofágica com os fatores combinados (IFN- γ + TNF- α) promove uma ativação macrofágica intensa (ADANS & HAMILTON, 1984). Neste contexto, é importante destacar que as junções comunicantes mediadas pela Cx43 são um componente importante para a manutenção da atividade de resposta imunológica no processo de inflamação e reparação tecidual (DE MAIO *et al.*, 2002; CHANSON, 2005; SHEN *et al.* (2018) e RODJAKOVIC, SALM e BELDI (2021), assim como na hematopoiese (MONTECINO-RODRIGUEZ *et al.*, 2000; MADHUMITA *et al.*, 2013), e com isso teriam sua expressão proteica aumentada.

Ao comparar a expressão da proteína Cx43 nas células da linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* por 48 horas, e tratadas com os fatores combinados nos horários de 24, 48 e 72 horas, com a expressão desta mesma proteína nas células J774-G8 infectadas por 48 horas, porém não tratadas (figura 49), foi possível identificar que houve uma diminuição significativa na expressão da Cx43 após 24 horas de tratamento com os fatores (figura 50B). Entretanto, as células infectadas (48 horas) e tratadas por 48 horas apresentaram um aumento significativo da expressão da Cx43, quando comparadas com células tratadas por 24 horas. Inclusive, esta elevação na expressão proteica da Cx43 se manteve de forma sustentada após as 72 horas de tratamento com os fatores, superando os níveis de expressão de antes do tratamento (Figura 50B).

E por fim, avaliamos a expressão da proteína Cx43 nas células macrofágicas J774-G8 infectadas com *T. gondii* por 72 horas, comparando esta expressão com as culturas de células tratadas com os fatores combinados (24, 48 e 72 horas) (figura 49). Nestes experimentos, os resultados apontaram para um decréscimo nos níveis de expressão proteica ao longo das horas de tratamento, quando comparados com os níveis de expressão de Cx43 apresentados nas 72 horas de infecção sem tratamento (figura 50C).

Como apresentado anteriormente, o tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios promovem a ativação de células macrofágicas. Entretanto, uma vez que a infecção é estabelecida, o protozoário promove diversas alterações na microestrutura celular e dentre estas mudanças destaca-se a reorganização das

organelas celulares na presença do parasita, aproximando-as do vacúolo parasitóforo (ATTIAS *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que após o *T. gondii* penetrar na célula hospedeira, as proteínas da porção basal da rotria são secretadas e promovem alterações no citosol celular. Dentre essas modificações, destacam-se a inibição da fusão dos lisossomos da célula hospedeira com a membrana do vacúolo parasitóforo e a redistribuição de outras organelas, incluindo as Mitocôndrias, o Retículo Endoplasmático e Complexo de Golgi, agora direcionadas para a proximidade do vacúolo parasitóforo, como mostrado na Figura 64 (ATTIAS *et al.*, 2020; FUKUMOTO *et al.*, 2021).

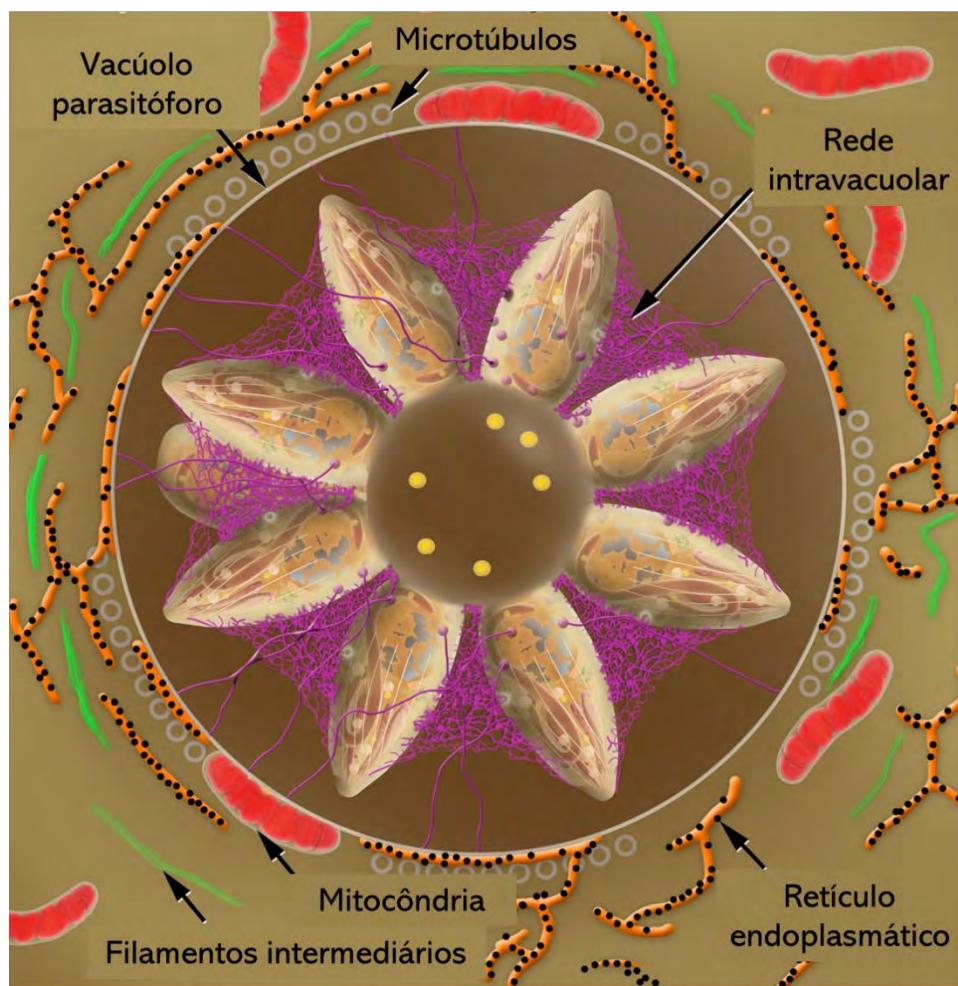


Figura 64: Imagem esquemática de um vacúolo parasitóforo (VP) em seção transversal mostrando taquizoítas ligados ao corpo residual. Dentro do corpo residual, acidocalcissomos (amarelo) são acumulados. Uma rede intravacuolar (magenta) estabiliza a roseta dos parasitas. Perfis do retículo endoplasmático (laranja) com ribossomos (preto) aderidos, microtúbulos (círculos cinza), filamentos intermediários (verde) e mitocôndrias (vermelho) da célula hospedeira, dispostos ao redor da VP (ATTIAS *et al.*, 2020).

Com base nestes dados, poderíamos especular que mesmo após a célula de linhagem macrofágica J774-G8 infectada com *T. gondii* ter sido ativada com os fatores pró-imuno inflamatórios, não seria possível aumentar os níveis de expressão da Cx43. Isto porque, mesmo com o estímulo para o aumento da expressão de proteína, dado o ambiente infecto-inflamatório, há o recrutamento de estruturas (organelas) pelo parasito para que possam viabilizar a sua manutenção (reprodução, ativação de vias metabólicas e de sinalização, produção de proteínas, dentre outras atividades). Assim, tais estruturas não conseguiriam atuar na síntese da proteína Cx43 por períodos superiores à 72 horas, como demonstrado mesmo a partir do tratamento com os fatores.

É importante destacar que a proteína Cx43 é sintetizada pelos ribossomos no retículo endoplasmático rugoso, sendo co-traduzida integralmente e fosforilada na membrana deste retículo, sendo após transportada para o Complexo de Golgi (SARMA *et al.*, 2001; SEGRETAIN e FALK, 2004; KOVAL *et al.*, 2014; LILY *et al.*, 2016). Após a oligomerização, a conexina permanece dentro de vesículas exocíticas, onde são transportadas do complexo de Golgi (agora na forma de Conexons) para a membrana plasmática da célula, através de microtúbulos (MUSIL e GOODENOUGH, 1993; DHEIN, 1998, GAIETTA *et al.*, 2002; SEGRETAIN e FALK, 2004; LAIRD 2006).

Deste modo, os resultados encontrados na verificação da expressão da proteína Cx43, em infecções de maior duração, poderiam ser justificados pelo processo de infecção do *T. gondii*, que está intimamente ligado à atividade do retículo endoplasmático rugoso e do Complexo de Golgi, permitindo a associação entre suas respectivas membranas e alterando a atividade das organelas responsáveis pela síntese da Cx43.

6.3. LOCALIZAÇÃO DA Cx43: ALTERAÇÕES NA INFECÇÃO E NO TRATAMENTO

O *T. gondii* é o agente causador da toxoplasmose. Este protozoário possui a característica de ser intracelular obrigatório, e é capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de animais homeotérmicos, incluindo assim os homens (ATTIAS *et al.*, 2020).

Diante deste quadro de infecção, diversos estudos têm sido realizados a fim de desvendar as ações do *T. gondii* na célula hospedeira. Dentre estes estudos, é imperativo destacar os que envolvem a comunicação juncional, uma vez que as junções comunicantes desempenham um papel crucial na homeostase de diversos sistemas orgânicos, principalmente em estudos associados às infecções parasitárias (DE CARVALHO *et al.*, 1998).

Nogueira *et al.* (2015) demonstrou que a infecção por *T. gondii* induz mudanças no complexo juncional de células epiteliais de pigmento da retina, alterando as junções de adesão. Isto, corroborando com os resultados apresentados anteriormente por De Carvalho *et. al.* (1998), de que este parasita promove alterações na homeostase celular, gerando alterações no complexo juncional de astrócitos.

Corroborando com este cenário, experimentos anteriores do nosso grupo de trabalho (2021) utilizando a linhagem celular macrofágica J774-G8 infectada com taquizoítas de *Toxoplasma gondii* demonstraram as alterações que atingiram o comportamento estrutural das junções comunicantes (formadas pela Cx43) e dos filamentos de F-actina, responsáveis pela formação do citoesqueleto. Este estudo indicou que houve a diminuição da colocalização dessas estruturas em células migratórias do sistema imunológico (DE CARVALHO *et al.*, 2021).

A Cx43, neste modelo, estaria retida no citoplasma, pois as proteínas responsáveis por sua ancoragem e endereçamento estariam desorganizadas ou em quantidades reduzidas na célula, o que dificultaria o encaminhamento e inserção da conexina na membrana, como apresentado abaixo na figura 65.

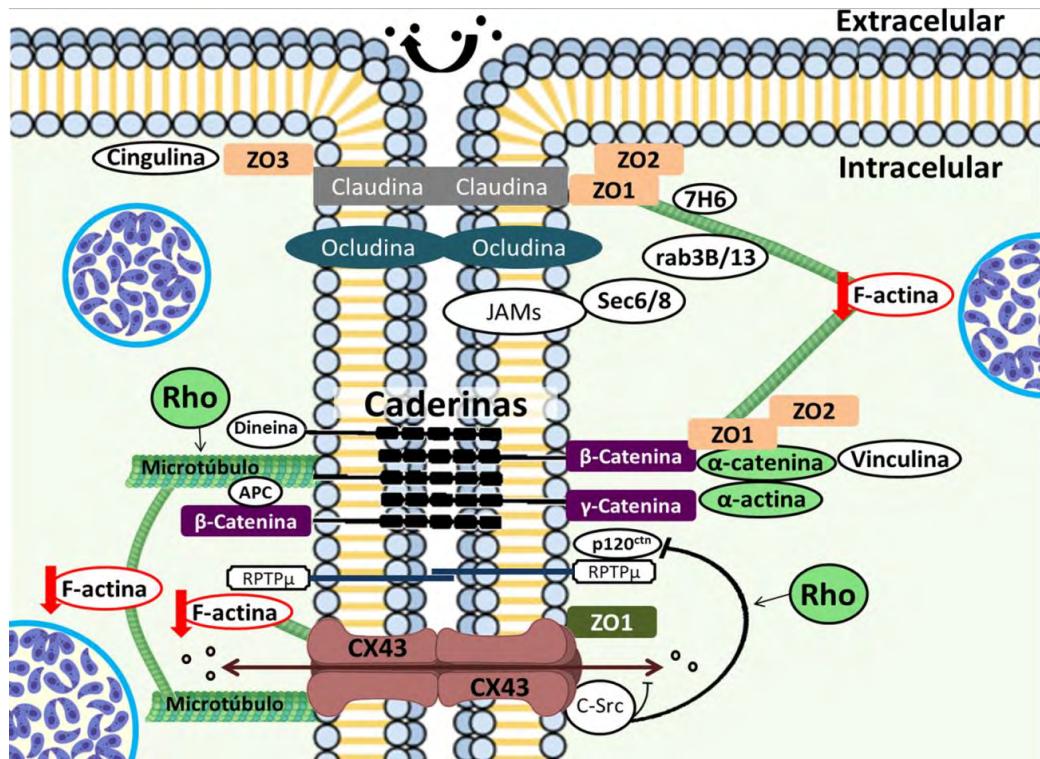


Figura 65: Esquema demonstrando as proteínas que possivelmente estão envolvidas com a inserção da Cx43 na membrana plasmática (adaptado de Giepmans, 2004).

Diante destes achados, e a fim de avaliar se o tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ +TNF- α) seriam capazes de impedir a desorganização do citoesqueleto (F-actina), bem como manter a inserção da proteína Cx43 na membrana plasmática, foram realizados experimentos de imunoflorescência nas seguintes situações, utilizando as células macrofágicas J774-G8: (1) Controle (não infectadas); (2) Não infectadas e tratadas com os fatores combinados por 24 e 48 horas; (3) Infectadas e não tratadas com o *Toxoplasma gondii* na proporção de 10 parasitas para uma célula nos horários de 24, 48 e 72 horas; e (4) Infectadas e tratadas com os fatores combinados nos horários de 24, 48 e 72 horas.

Os resultados da figura 51 indicaram a presença da Cx43 na membrana plasmática, bem como a manutenção da estrutura de citoesqueleto nas células J774-G8 sem infecção ou tratamento (figuras 51B e 51C). Estes resultados foram confirmados pela figura 51A, que indicou a colocalização da proteína Cx43 com os filamentos de F-actina na membrana plasmática, demonstrando a homeostase celular em condições celulares basais. Estes dados, inclusive, são corroborados com os achados por FORTES *et al.* (2004), em que a Cx43 foi

identificada na membrana plasmática de células J774-G8 e formavam junções comunicantes funcionais.

Do mesmo modo, os resultados de imunofluorescência das células macrofágicas J774-G8 não infectadas, porém tratadas com IFN- γ +TNF- α no período de 24 e 48 horas, respectivamente, evidenciaram a colocalização da Cx43 com os filamentos de F-actina, que se encontravam distribuídos de forma homogênea no interior das células ativadas (Figura 52 e 53).

Estes resultados corroboram com os dados da literatura, que indicam os macrófagos como células de grande plasticidade funcional, capazes de alterar seus mecanismos de atividade fisiológica em resposta aos estímulos. Portanto, seria o microambiente inflamatório o responsável por modular o estado de ativação destes macrófagos em processos patológicos diversos (TA; CHAWLA e POLLARD, 2013).

Ao avaliar os resultados de imunofluorescência das células J774-G8 infectadas com *T. gondii* por 24 horas, sem o tratamento com os fatores, foi demonstrada a colocalização da Cx43 com os filamentos de F-actina (marcado com faloidina) apenas em células não infectadas (figura 54A). Entretanto, em células infectadas o citoesqueleto marcado pelos filamentos de F-actina encontrava-se desorganizado (figura 54B), e a expressão da Cx43 na membrana plasmática das células não estava presente (figura 54C), o que indicou a ausência de colocalização nestas células.

A mesma análise foi empregada nas células J774-G8 infectadas por 48 e 72 horas, e que não foram tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (figuras 55 e 56). Em ambas as situações, só foram identificadas colocalizações em células não infectadas pelo *T. gondii* (figuras 55A e 56A), uma vez que nas células infectadas havia a desorganização do citoplasma (figuras 55B e 56B) e a diminuição da expressão de Cx43 (figuras 55C e 56C).

Portanto, diante destes achados é valido relembrar que o protozoário intracelular influencia o posicionamento das organelas que estão ligadas a síntese de Cx43 (ATTIAS *et al.*, 2020; como também altera a organização do citoesqueleto celular (DE CARVALHO *et al.*, 2020). Desta forma, o citoesqueleto de células não infectadas permite o posicionamento da Cx43 na membrana plasmática, como resultado de utilização das organelas devidas em nestas células.

Buscando entender a ação dos fatores pró-imuno inflamatórios na distribuição da proteína Cx43 em macrófagos, foram realizados experimentos de imunofluorescência em culturas infectadas e tratadas.

Ao tratar as culturas de células da linhagem macrofágica J774-G8 infectadas por 24 horas com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (24 e 48 horas de tratamento), observamos que as células não infectadas mantinham a marcação para a proteína Cx43 na membrana plasmática (figuras 57C e 58C), bem como a organização do citoesqueleto (figuras 57B e 58B), inclusive mantendo pontos de colocalização (figuras 57A e 58A). Entretanto, nas células infectadas presentes na cultura, e que possuíam um citoesqueleto desorganizado, foi possível identificar que os níveis de marcação para a Cx43 se mantinham, contudo, no citoplasma (figuras 57C e 58C).

Estes dados, como já demonstrado nas análises da expressão proteica por *Western blot*, poderiam ser explicados pela ativação das células macrofágicas pelo IFN- γ +TNF- α , que auxiliam as alterações fisiológicas destas células para que possam desenvolver respostas à infecção, o que pode tender a aumentar o acoplamento celular, dada a formação de junções comunicantes funcionais formadas pela proteína Cx43 (EUGENIN *et al.* 2001; EUGENIN *et al.* 2003).

O aumento da expressão da proteína Cx43 também estaria relacionado aos mecanismos de diferenciação e migração celular, apresentação de抗ígenos, liberação de ATP (utilizado como regulação autócrina e comunicação parácrina por células do sistema imune) através das junções comunicantes em células ativadas para as células em repouso, liberação de ROS, dentre outros, sendo necessários mais estudos para avaliar as alterações estimuladas pelo tratamento no microambiente (EUGENIN *et al.*, 2003; ZUMERLE *et al.*, 2019; RODJAKOVIC, SALM e BELDI, 2021).

Porém, foi possível observar que a infecção com os parasitas pode alterar a organização celular, como destacado por Seabra *et al.*(2004) ao relacionar a inibição da produção de NO com a infecção por *T. gondii*, sendo capaz de despolimerizar as proteínas de F-actina no processo de infecção, e desorganizar o citoesqueleto celular.

Assim, podemos indicar que o citoesqueleto interage intimamente com a Cx43 neste modelo, pelo fato da proteína Cx43 não estar presente na membrana

das células infectadas da linhagem J774-G8, e que apresentam a desorganização no citoesqueleto, com a ausência da marcação para F-actina (Faloidina). Esta hipótese pode ser elucidada na figura 65, que nos demonstra a intima relação entre as proteínas de citoesqueleto na manutenção e inserção das proteínas do complexo juncional na membrana plasmática (GIEPMANS, 2004).

Nas figuras 60, 61 e 62, em que há a representação dos experimentos de imunofluorescência com as células de linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com o *T. gondii* no período de 48 horas, passando pelo tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ + TNF- α) nos períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, bem como na figura 63 (72 horas de infecção e 48 horas de tratamento), foram encontrados resultados semelhantes aos apresentados nas figuras 57, 58 e 59. Porém, sem a presença dos pontos de colocalização por conta da perda de marcação das proteínas do citoesqueleto.

Além das organelas já descritas envolvidas com o recrutamento de conexinas, é possível indicar neste contexto as mitocôndrias. Segundo BOENGLER et. al. (2022), a Cx43 atua nas mitocôndrias auxiliando-as no processo de respiração celular, na manutenção da permeabilidade à moléculas e na regulação do fluxo de íons junto ao citoplasma da célula.

Contudo, Guimarães, Carvalho e Barbosa (2009) publicaram um artigo que abordava o recrutamento de mitocôndrias de células musculares pelo *T. gondii*, em que o parasita reorganizava as mitocôndrias do hospedeiro ao redor do vacúolo parasitóforo (VP).

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), adquiridas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa indicaram a interação da mitocôndria com o VP (Figura 66). Nesta micrografia é possível observar a imagem um cisto recém-formado com os taquizoítas se diferenciando em bradizoítas, e as mitocôndrias celulares (MT) ligadas a sua membrana. Na figura 66A é possível identificar a aproximação das mitocôndrias ao vacúolo parasitóforo (VP) e a seta indica a área ampliada na figura B, onde é possível identificar uma mitocôndria próxima ao cisto, inferindo uma possível associação entre as membranas.

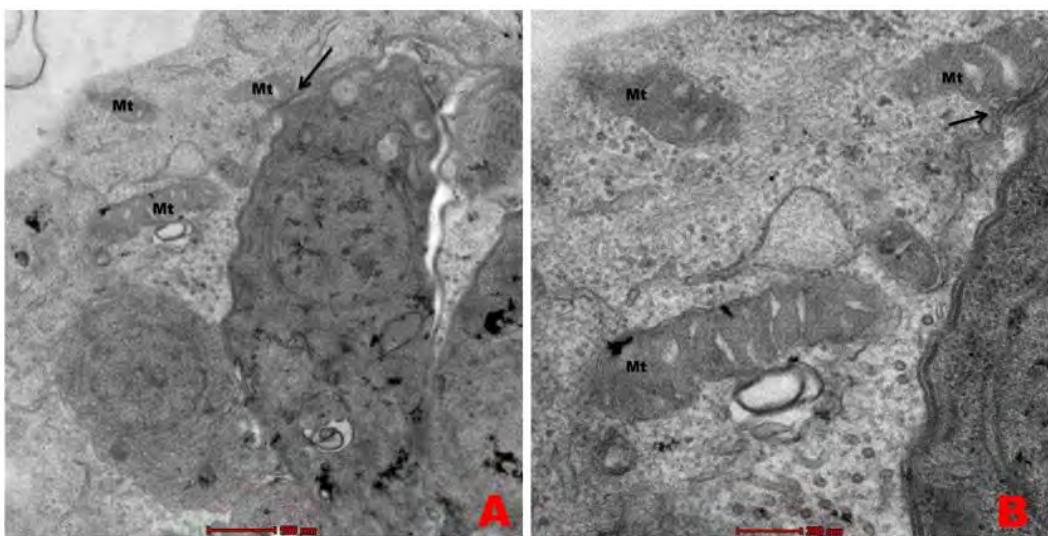


Figura 66: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da célula muscular epitelial infectada com taquizoíta de *Toxoplasma gondii* com o crescimento de 20 horas, demonstrando a associação do VP, contendo bradizoíta (B). Em A, a barra indica uma área de 500 nanômetros, e em B a barra indica uma área de 200 nanômetros. Imagens obtidas em 2013 pelo grupo de pesquisas chefiado pelo Dr. Sergio H. Seabra.

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção de energia nas células, sendo as mesmas revestidas por um sistema de membrana dupla, que consiste em uma membrana interna e uma membrana externa, com um pequeno espaço intermembranar entre elas. Além de seus papéis na produção de energia, oxidação de ácidos graxos e divisão e diferenciação celular, estudos recentes revelaram que as mitocôndrias também podem regular a morte celular por apoptose e a sinalização imunológica (TIKU, TAN e DIKIC, 2020).

Esta organela também está envolvida na resposta imune do hospedeiro, incluindo a modulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação de macrófagos (DE SOUZA BREDA, et al., 2019; ZHANG et al., 2022). E, além disso, alguns estudos indicam a presença da Cx43 em sua membrana externa, que teria a função de preservar a produção de ATP sob a situação de estresse metabólico (SHIMURA e SHAW, 2022).

Sabe-se que a Cx43 também atua como canal para o deslocamento de íons de cálcio no processo de resposta imunológica (TITTARELLI et al., 2020). Nas mitocôndrias, o íon cálcio atua como um regulador importante na via metabólica, determinando a velocidade de síntese de ATP. A captação de cálcio para a matriz mitocondrial ocorre através de um canal uniporter que é impulsionado pelo potencial da membrana mitocondrial interna, que atrai

espécies positivamente carregadas (AUGUSTO *et al.*, 2020; BOENGLER *et al.*, 2022).

Contudo, os íons de Ca^{++} também possuem um papel importante para a manutenção do *T. gondii* intracelular. No interior do vacúolo parasitóforo os Acidocalcissomas são depósitos de ácidos de cálcio que possuem uma matriz ácida contendo vários cátions ligados a fosfatos. Sua matriz é acidificada pela ação de bombas de prótons, e a captação de cálcio ocorre por meio de um co-transportador ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ATPase) localizado na membrana da organela. No entanto, várias propriedades bioquímicas dos acidocalcissomas de *T. gondii* ainda precisam ser definidas, porém, foi sugerido que estas estruturas estejam envolvidas com as roptrias maduras e em formação, pois são os únicos compartimentos ácidos em taquizoítas de *T. gondii* (ROHLOFF *et al.*, 2011).

Miranda *et al.* (2008) cita que na membrana dos acidocalcissomos existem uma Ca^{2+} -ATPase envolvida com influxo de Ca^{2+} , e duas bombas de prótons, uma H^+ -ATPase vacuolar e H^+ -pirofosfatase vacuolar, que atuam na acidificação deste compartimento.

Por outro lado, é importante discutir que durante o processo de infecção e reinfecção do protozoário, os conteúdos proteicos secretados pelos micronemas são essenciais para a movimentação do protozoário e sua associação com a membrana da célula hospedeira (CARRUTHERS e SIBLEY, 1997), sendo este processo de infecção modulado pela concentração de íons Ca^{++} .

Corroborado com dados apresentados da literatura, a secreção destas proteínas é aumentada na presença de cálcio, de modo que o aumento da obtenção de Ca^{++} pelo parasita intracelular resulta no aumento do processo de multiplicação celular e induz a lise da célula hospedeira. Portanto, caso ocorra o aumento da concentração intracelular de cálcio, também haverá aumento da secreção destas proteínas e assim a aceleração do ciclo de replicação do parasita (MONDRAGON e FRIXIONE, 1996; HOFF e CARRUTHERS, 2002; LOVETT *et al.*, 2002; HETZ, ZHANG, e KAUFMAN, 2020; AUGUSTO *et al.*, 2020).

Após sucessivos ciclos de divisão celular do *T. gondii*, é estimulado o influxo de Ca^{++} que induz a saída dos taquizoítas pelo rompimento da membrana da plasmática da célula hospedeira, liberando esses novos taquizoítas que

podem infectar novas células no espaço extracelular (MONDRAGON e FRIXIONE, 1996).

Segundo BOENGLER et. al. (2022), a Cx43 atua nas mitocôndrias auxiliando-as no processo de respiração celular, na manutenção da permeabilidade à moléculas e na regulação do fluxo de íons junto ao citoplasma da célula. A redução da expressão da Cx43, presente na membrana da mitocôndria, poderia influenciar na redução do rompimento celular devido o Ca^{++} ser o principal íon transportado por este canal.

Com isto, a redução do transporte de cálcio pode ser um mecanismo célula aumentar a manutenção intracelular do vacúolo parasitóforo a fim de evitar a infecção de novas células.

Vale ressaltar que durante a infecção pelo *T. gondii* as mitocôndrias hospedeiras se fundem restringindo o crescimento do parasita intracelular através da limitação da absorção de ácidos graxos. Pernas et al. (2018) indicou que a infecção por Toxoplasma desencadeia a lipofagia, a autofagia das gotículas lipídicas do hospedeiro, e a fusão da mitocôndria com o vacúolo parasitóforo é um mecanismo de defesa para restringir a disponibilidade dos ácidos graxos celulares e reduzir a proliferação parasitária através da limitação de acesso aos nutrientes do hospedeiro liberados pela lipofagia.

Assim, no processo de indução da autofagia em eucariontes, a célula mobiliza ácidos graxos e partículas lipídicas que sofrem lipofagia (REGGIORI e KLIONSKY, 2002). As mitocôndrias se alongam e sua superfície de cristas aumenta, para evitar a degradação autofágica e maximizar a eficiência da produção de ATP (GOMES, BENEDETTO e SCORRANO, 2011; Pernas et al., 2014). Essas alterações morfológicas aumentam a eficiência da β -oxidação, aumentando a associação mitocondrial aos ácidos graxos e partículas lipídicas (PERNAS e SCORRANO, 2016).

Desta forma, a característica multifuncional da mitocôndria a torna um alvo valioso para patógenos intracelulares (KELLERMANN, SCHARTE e HENSEL, 2021).

De modo semelhante, o retículo endoplasmático serve como depósito de íons Ca^{2+} , capaz de regular vias de sinalização dependentes, como contração muscular ou apoptose em vários órgãos (STUTZMANN e MATTSON, 2011; PRINZ, TOULMAY e BALLA, 2020). Como está sendo abordado, o *T. gondii*

estabelece um contato estreito com organelas do hospedeiro que podem contribuir para a manipulação de vias celulares (AUGUSTO *et al.*, 2020).

A via UPR (Unfolded Protein Response) é uma resposta celular ao acúmulo de proteínas desenoveladas no lúmen do retículo endoplasmático, induzida por uma variedade de estímulos externos e internos, incluindo acúmulo de proteínas mal formadas. Alterações na função do retículo endoplasmático podem resultar no acúmulo de proteínas desenoveladas, uma condição celular conhecida como estresse do retículo endoplasmático que envolve a resposta de UPR para manter a viabilidade celular (HETZ, 2012).

Deste modo, a via UPR possui funções importantes nas cadeias de sinalização que são fundamentais para o controle do metabolismo lipídico e energético, imunidade inata e programas de diferenciação celular (HETZ, 2012).

A UPR está interligada em diferentes níveis com as vias de resposta imune inata, a primeira linha de defesa contra patógenos e também está envolvida na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo essa via um mecanismo de defesa a parasitemia (YAMAMOTO *et al.*, 2011; MARTINON *et al.*, 2010.).

Condições de estresse crônico ou irreversível do RE desencadeiam a morte celular por apoptose, um processo que envolve a ativação da via mitocondrial e tem sido associado à muitas doenças, incluindo câncer, neurodegeneração, isquemia, parasitemias e diabetes (KIM *et al.*, 2008; LALIBERTE e CARRUTHERS, 2008; GALLUZZI, DIOTALLEVI e MAGNANI, 2017).

Corroborando com os resultados apresentados o artigo publicado por Augusto *et al.* (2020) demonstra que a UPR é prejudicada durante a patogênese de *T. gondii* através da manipulação do efluxo de Ca²⁺ do retículo endoplasmático, levando à ativação do sensor de estresse e desorganizando o citoesqueleto, promovendo a migração da célula hospedeira e a disseminação do parasita (HETZ, ZHANG, e KAUFMAN, 2020; PONCET *et al.*, 2021).

De forma semelhante, o *T. gondii* também provoca rearranjos do Complexo de Golgi para melhorar o suprimento nutricional dos parasitas e promover a sua proliferação (ROMANO *et al.*, 2017; VENUGOPAL *et al.*, 2020). Entretanto, o Complexo de Golgi é fundamental no processo de formação da Cx43, pois esta proteína é estabilizada como monômeros no retículo

endoplasmático e só se oligomeriza após o transporte para o Complexo de Golgi (KOVAL et al., 2014).

Deste modo, diante dos achados apresentados até o momento, pontuamos uma das hipótese da influência do parasita na modulação do posicionamento da mitocôndria ao redor do vacúolo parasitóforo para o direcionamento de produtos necessários para a sua manutenção intracelular, como ATP, e o sequestro de íons de cálcio que são permeáveis pelos canais juncionais formados pela Cx43 na membrana de mitocôndrias.

De forma associada, o parasita estimula a desorganização do citoesqueleto, evitando a inserção da Cx43 na membrana plasmática, mantendo-a no citoplasma da célula infectada. Com isto, o próprio parasita conseguiria regular os canais presentes na membrana mitocondrial, controlando o rompimento da membrana plasmática, e o processo de liberação do *T. gondii* para o meio, infectando assim novas células.

6. CONCLUSÃO

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

- 1) Em relação ao perfil morfológico das células J774-G8:
 - Houve a melhora no perfil morfológico das células de Linhagem Macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* tratadas com os fatores pró-imuno-inflamatórios individuais e conjugados (IFN- γ , TNF- α e TNF- α + IFN- γ), em relação à cultura não tratada. Destaca-se como melhora: manutenção do aspecto morfológico celular do microambiente, a redução do número de parasitas livres no meio, a manutenção do crescimento celular e a formação de grumos celulares;
 - O perfil morfológico das células da linhagem macrofágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* apresentou o melhor resultado em todos os tempos analisados (24, 48 e 72 horas) quando tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios conjugados (TNF- α + IFN- γ) quando comparado com o tratamento individual do IFN- γ e individual do TNF- α . Nas condições de tratamento individual com os fatores, foi identificado que os aspectos morfológicos, a manutenção do

crescimento celular e a formação de grumos ficaram abaixo do obtido com o tratamento conjugado;

2) Em relação a expressão da proteína conexina 43 através de ensaios imunoelétroforéticos das células J774-G8:

- O tratamento com os fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ e TNF- α) por 72 horas aumentou significativamente a expressão da proteína Cx43 nas células da linhagem J774-G8;
- As células de Linhagem Macrófágica J774-G8 infectadas com o *T. gondii* por 24 e 48 horas apresentaram aumento da expressão proteica da Cx43 quando tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios conjugados nos períodos de 48 e 72 horas;
- As células de Linhagem Macrófágica J774-G8 infectadas com o *T. gondii* por 72 horas apresentaram queda na expressão proteica da Cx43 quando tratadas com os fatores pró-imuno inflamatórios conjugados por períodos de 48 e 72 horas;

3) Em relação a localização da proteína conexina 43 das células J774-G8 e a correlação entre a localização/expressão das proteínas Conexina 43 e F-actina:

- A infecção com *T. gondii* em células de Linhagem Macrófágica J774-G8 (não tratadas) promoveu a redução da marcação para a proteína Cx43 na membrana plasmática das células;
- As células de Linhagem Macrófágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* apresentaram uma redução gradual da marcação de Cx43 na membrana plasmática, acompanhada da desorganização do citoesqueleto destas células em 24, 48 e 72 horas.
- O tratamento com fatores pró-imuns inflamatórios combinados (IFN- γ e TNF- α) promoveu a ativação e o remodelamento das células de Linhagem Macrófágica J774-G8 resultando em: (1) aumento da expressão da Cx43 na membrana plasmática; (2) a diminuição dos pontos de colocalização com o citoesqueleto e (3) o aumento da marcação da Cx43 no citoplasma celular.

- As células de Linhagem Macrófágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* 24 horas tratadas com fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ e TNF- α) promovem a diminuição da desorganização do citoesqueleto provocado pela infecção parasitária, apresentando marcação pontual na membrana plasmática para Cx43 e a marcação dispersa no citoplasma celular, em células não infectadas na mesma cultura;
- As células de Linhagem Macrófágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* 48 horas tratadas com fatores pró-imuno inflamatórios combinados (IFN- γ e TNF- α) promovem a resposta celular apresentando pontos de marcação na membrana plasmática para Cx43, em 24 e 48 horas, e a marcação dispersa no citoplasma celular em 72 horas de tratamento, porém sem a reversão dos danos;
- As células de Linhagem Macrófágica J774-G8 infectadas com *T. gondii* tratadas por 72 horas com fatores pró-imuninos inflamatórios combinados (IFN- γ e TNF- α), no tempo avaliado de 48 horas promoveu uma resposta celular podendo ser observados pontos de manutenção da marcação para Cx43 na membrana plasmática, mas sem a reversão dos danos no posicionamento da proteína em relação a membrana plasmática.
- O tratamento com fatores pró-imuninos inflamatórios combinados (IFN- γ e TNF- α) na Linhagem Celular Macrófágica J774-G8 infectada com *T. gondii* promoveu a ativação celular, entretanto o protozoário acarretou danos de desorganização do citoesqueleto celular impedindo o transporte e o ancoramento da CX43 para a membrana, o que resultou na retenção da Cx43 no citoplasma celular. Em conjuntos, esses danos causados pela parasitemia, são irreversíveis para a célula.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular** - Rio de Janeiro: Elsevier, 7^a edição, 2011.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Ann Rev of Immunol** v. 17, p. 593 – 623, 1999.

ALBERTS B., *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Publishing, 3^a ed., 1994.

ALVES, L.A. *et al.* Gap junction modulation by extracellular signaling molecules: the thymus model. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 33, p. 457–465, 2000.

ATTIAS, M. *et al.* The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. **Parasites & vectors**, v. 13, p. 1-13, 2020.

AUGUSTO, L. *et al.*; *Toxoplasma gondii* co-opts the unfolded protein response to enhance migration and dissemination of infected host cells. **Mbio**, v. 11, n. 4, p. e00915-20, 2020.

BAHIA-OLIVEIRA, Lílian Maria Garcia et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 1, p. 55, 2003.

BALKWILL, F.R.; BURKE, F. The cytokine network. **Immunol.** v. 10, p. 299–304, 1989.

BENNET, M.V.L. *et al.* New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. **Trends Neurosci.** v. 26, p. 610–617, 2003.

BENNETT P.B. , VALENZUELA C , CHEN LQ , KALLEN RG , On the molecular nature of the lidocaine receptor of cardiac Na⁺ channels. Modification of block by alterations in the alpha-subunit III-IV interdomain. **Circ Res.** v. 77, n. 3, p. 584-592, 1995.

BENNETT, M.V. *et al.*; Gap junctions: new tools, new answers, new questions. **Neuron** v. 6, p. 305-320, 1991.

BEYER, E.; STEINBERG TH. Connexin, gap-junction proteins, and ATP-induced pores in macrophages. **Progr Cell Res** v. 3, p. 71-74, 1993.

BEYER, E.C.; STEINBERG, T.H. Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. **J. Biol. Chem.** v. 266, n. 7971, 1991.

BEYER, E; STEINBERG TH. Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. **J. Biol. Chem.** v.266, p. 7971-7974, 1991.

BOEHM, U. *et al.* Cellular responses to interferon-gamma. **Ann Rev of Immun** v. 15, p. 749 – 795, 1997.

BOENGLER, K. *et al.* Connexin 43 in Mitochondria: What Do We Really Know About Its Function?. **Frontiers in Physiology**, p. 1188, 2022.

BOENGLER, K. *et al.* Connexin 43 in Mitochondria: What Do We Really Know About Its Function?. **Frontiers in Physiology**, p. 1188, 2022.

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J.F. Kiss and spit: the dual roles of Toxoplasma rhoptries. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 79-88, 2008.

Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 72, p. 248-54, 1976.

BRADLEY, P.J.; SIBLEY, L. D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 582-587, 2007.

BRITZ-CUNNINGHAN, S.H.; Mutations of the connexin43 gap junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. **New Engl J Med** v. 332, p.1323-29, 1995.

BRUZZONE, R; WHITE, TW; GOODENOUGH, DA. The cellular internet: on- line with connexins. **BioEssays** v.18, n.9, p. 709-718, 1996.

BURT J.M.; SPRAY D.C.; Inotropic agents modulate gap junctional conductance between cardiac myocytes. **Am J Physiol** v.254, p.1206-1210, 1988.

CAFFARO, C.E.; BOOTHROYD, J.C. Evidence for host cells as the major contributor of lipids in the intravacuolar network of Toxoplasma-infected cells. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 8, p. 1095-1099, 2011.

CAMPOS DE CARVALHO A.C., *et al.* Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with Trypanosoma cruzi. **Circ. Res.** v.70, p. 733–742, 1992.

CAMPOS DE CARVALHO A.C., *et al.* Gap Junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as a consequence of protozoan infection. **Brain Res.** v.20, n.790 p. 304-314, 1998.

CARRERAS-SUREDA, A.; PIHAN, P.; Hetz, C. Sinalização de cálcio no retículo endoplasmático: ajuste fino das respostas ao estresse. **Cell Calcium** , v.70 , p. 24-31, 2018.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. **European journal of cell biology**, v. 73, n. 2, p. 114-123, 1997.

CASEY B.; BALLABIO A. Connexin 43 mutations in sporadic and familial defects of laterality. **N Engl J Med.** v. 333 n. 14 p. 941-942, 1995.

CDC. Toxoplasmose - epidemiologia e fatores de risco. Atlanta: Centros de Controle e Prevenção de Doenças; 2018. Disponível em <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>. Acessado em 08 de abril de 2023 as 20:05h

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

CHARRON, Audra J.; SIBLEY, L. David. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of cell science**, v. 115, n. 15, p. 3049-3059, 2002.

CHEN, G. *et al.* NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. **Annual review of pathology**. v. 4, p. 365-98, 2009.

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

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

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

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

CROOKE, S.N. *et al.* Immunosenescence: A systems-level overview of immune cell biology and strategies for improving vaccine responses. **Experimental gerontology**. v. 124, n. 110632, 2019.

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

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

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

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

DE MENDONÇA, João Silva. Princípios gerais de terapêutica. **de Souza W, Belfort Jr R. Toxoplasmose e Toxoplasma gondii. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 209-14, 2014.**

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

DE SOUZA BREDA, Cristiane Naffah *et al.* Mitochondria as central hub of the immune system. **Redox biology**, v. 26, p. 101255, 2019.

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

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

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

DEROUIN, F. *et al.* Experimental models of toxoplasmosis. Pharmacological applications. **Parasite (Paris, France)**, v. 2, n. 3, p. 243-256, 1995.

DESMONTS, G. *et al.* ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE SUR LA TOXOPLASMOSE- DE LINFLUENCE DE LA CUISSON DES VIANDES DE BOUCHERIE SUR LA FREQUENCE DE LINFECTION HUMAINE. **REVUE FRANCAISE D ETUDES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES**, v. 10, n. 9, p. 952-&, 1965.

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

DUARTE, A.G.P. *et al.* Anti-toxoplasma gondii effect of metalocomplex compounds N0414 and N5814. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 16541-16555, 2021.

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

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P. Long-term persistence of Toxoplasma gondii in tissues of pigs inoculated with T gondii oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American journal of veterinary research**, v. 49, n. 6, p. 910-913, 1988.

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

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

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **The Journal of protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155-177, 1972.

DUBEY, J. P.; HILL, D. Toxoplasma gondii: Transmission and Prevention. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.

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

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, CA106833. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUNCANSON, Phil *et al.* High levels of congenital transmission of Toxoplasma gondii in a commercial sheep flock. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 14, p. 1699-1703, 2001.

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

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

ENGLISH, Elizabeth D.; BOYLE, Jon P. Impact of engineered expression of mitochondrial association factor 1b on *Toxoplasma gondii* infection and the host response in a mouse model. ***MspHERE***, v. 3, n. 5, p. e00471-18, 2018.

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

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

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

FERGUSON, D.J.P.; BIRCH-ANDERSEN, J. C.S.; HUTCHISON W. M. Observations on the ultrastructure of the sporocyst and the initiation of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*. ***Acta Pathol Microbiol***. v. 86, p.165–167, 1978.

FERGUSON, David JP. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra?. ***Trends in parasitology***, v. 18, n. 8, p. 351-355, 2002.

FERGUSON, David JP. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. ***Memorias do Instituto Oswaldo Cruz***, v. 104, p. 133-148, 2009.

FERREIRA, Flávia Batista *et al.* Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) and *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 12, p. 42-45, 2020.

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

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

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

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

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

FUKUMOTO, Junpei *et al.* Rhopty kinase protein 39 (ROP39) is a novel factor that recruits host mitochondria to the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **Biology open**, v. 10, n. 9, p. bio058988, 2021.

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

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

Galluzzi, L., Diotallevi, A., & Magnani, M. (2017). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in infection by intracellular parasites. **Future science OA**, 3(3), FSO198.

Giepmans BN¹. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res.* 2004 May 1;62(2):233-45.

GILBERT, Ruth E. et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, p. e277, 2008.

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

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

GOMES, Ligia C.; BENEDETTO, Giulietta Di; SCORRANO, Luca. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology*, v. 13, n. 5, p. 589-598, 2011.

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

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

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

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

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **European journal of immunology**, v. 37, n. S1, p. S9-S17, 2007.

GRAINDORGE, Arnault *et al.* The conoid associated motor MyoH is indispensable for *Toxoplasma gondii* entry and exit from host cells. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 1, p. e1005388, 2016.

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

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

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

HAMMEL, J.H *et al.* Modeling Immunity In Vitro: Slices, Chips, and Engineered Tissues. **Annual review of biomedical engineering**. v. 23 p. 461-491, 2021.

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

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

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

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

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

Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(2), 89-102.

HETZ, Claudio; ZHANG, Kezhong; KAUFMAN, Randal J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 8, p. 421-438, 2020.

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

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

HOFF, Eleanor F.; CARRUTHERS, Vern B. Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion?. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 6, p. 251-255, 2002.

HORN JR, Adolfo *et al.* Highly efficient synthetic iron-dependent nucleases activate both intrinsic and extrinsic apoptotic death pathways in leukemia cancer cells. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 128, p. 38-47, 2013.

HU, Ke *et al.* Cytoskeletal components of an invasion machine—the apical complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 2, p. e13, 2006.

inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. *Parasitology International* 63 (2014) 659–663.

JACOBS, Leon; REMINGTON, Jack S.; MELTON, Marjorie L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of parasitology**, v. 46, n. 1, p. 11-21, 1960.

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

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

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. **Experimental parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10-25, 2010.

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

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

JOYCE, Bradley R. *et al.* The unfolded protein response in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* features translational and transcriptional control. *Eukaryotic cell*, v. 12, n. 7, p. 979-989, 2013.

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

KAFSACK, Björn FC; CARRUTHERS, Vern B. Apicomplexan perforin-like proteins. **Communicative & integrative biology**, v. 3, n. 1, p. 18-23, 2010.

KALANI, Hamed *et al.* Comparison of eight cell-free media for maintenance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Iranian journal of parasitology**, v. 11, n. 1, p. 104, 2016.

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

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

KELLERMANN, Malte; SCHARTE, Felix; HENSEL, Michael. Manipulation of host cell organelles by intracellular pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6484, 2021.

KIM, Ji Yeon *et al.* Interaction between parasitophorous vacuolar membrane-associated GRA3 and calcium modulating ligand of host cell endoplasmic reticulum in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. **The Korean journal of parasitology**, v. 46, n. 4, p. 209, 2008.

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

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

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

Lago, E. G., Neto, E. C., Melamed, J., Rucks, A. P., Presotto, C., Coelho, J. C., ... & Fiori, R. M. (2007). Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. **Paediatric and perinatal epidemiology**, 21(6), 525-531.

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

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

LAIRD, Dale W.; LAMPE, Paul D. Cellular mechanisms of connexin-based inherited diseases. **Trends in Cell Biology**, v. 32, n. 1, p. 58-69, 2022

LALIBERTE, Julie; CARRUTHERS, Vernon B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and molecular life sciences**, v. 65, p. 1900-1915, 2008.

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

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

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

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

LIMA, Tatiane S.; LODOEN, Melissa B. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 103, 2019.

LIMA, Tatiane S.; LODOEN, Melissa B. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 103, 2019.

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

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

LOPES-MORI, Fabiana Maria Ruiz *et al.* Programas de controle da toxoplasmose congênita. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 5, p. 594-599, 2011.

LOURIDO, Sebastian. *Toxoplasma gondii*. PARASITE OF THE MONTH, VOLUME 35, ISSUE 11, P944-945, NOVEMBER 2019.

LOVETT, Jennie L. *et al.* *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca²⁺ release from inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP₃)/ryanodine-sensitive stores. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 25870-25876, 2002

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

LYONS, Russell E.; MCLEOD, Rima; ROBERTS, Craig W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite–bradyzoite interconversion. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 5, p. 198-201, 2002.

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

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

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

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

MANN, Tara; BECKERS, Con. Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 115, n. 2, p. 257-268, 2001.

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

MARTINON, Fabio *et al.* Toll-like receptor activation of XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 411, 2010.

MARTINS-DUARTE, Erica S. et al. In vitro activity of N-phenyl-1, 10-phenanthroline-2-amines against tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 116467, 2021.

MONDRAGON, RICARDO; FRIXIONE, EUGENIO. Ca²⁺-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 120-127, 1996.

MONDRAGON, RICARDO; FRIXIONE, EUGENIO. Ca²⁺-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 120-127, 1996.

MONDRAGON, RICARDO; FRIXIONE, EUGENIO. Ca²⁺-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 120-127, 1996.

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

MONTEIRO, V. G. *et al.* Morphological changes during conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites treated with calcium ionophore. **Journal of structural biology**, v. 136, n. 3, p. 181-189, 2001.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

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

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

MURRAY, P.J. Macrophage Polarization. **Annual review of physiology** v. 79, p. 541-566, 2017.

MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

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

NATH, M.; POKHARIA, S.; YADAV, R. Calix [4] arenes as Molecular Platforms in Magnetic Resonance Imagery. **Coord. Chem. Rev.**, v. 215, p. 99-149, 2001.

NICOLLE, Charles. Sur une infection a corps de Leishman (on organismes voisons) du gondi. **CR Acad Sci**, v. 147, p. 736, 1908.

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

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

of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol.*

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

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

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

Padrão, J.C., Cabral, G.R. A.; Silva, M.F.S.; Seabra, S.H.; DaMatta, R. A. *Toxoplasma gondii* infection of activated J774-A1 macrophages causes

PAREDES-SANTOS, Tatiana Christina; DE SOUZA, Wanderley; ATTIAS, Márcia. Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. **Journal of structural biology**, v. 177, n. 2, p. 420-430, 2012.

PARK, Jeongho; HUNTER, Christopher A. The role of macrophages in protective and pathological responses to *Toxoplasma gondii*. **Parasite immunology**, v. 42, n. 7, p. e12712, 2020.

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

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

PERNAS, Lena *et al.* Mitochondria restrict growth of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by limiting its uptake of fatty acids. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 886-897. e4, 2018.

PERNAS, Lena *et al.* *Toxoplasma* effector MAF1 mediates recruitment of host mitochondria and impacts the host response. **PLoS biology**, v. 12, n. 4, p. e1001845, 2014.

PERNAS, Lena; SCORRANO, Luca. Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. **Annual review of physiology**, v. 78, p. 505-531, 2016.

Pinkerton, H. , and David W. . "Toxoplasma infection in man." *Arch. Pathol.* 30.1 (1940).

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

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

PONCET, Anaïs F. *et al.* The UPR sensor IRE1 α promotes dendritic cell responses to control *Toxoplasma gondii* infection. **EMBO reports**, v. 22, n. 3, p. e49617, 2021.

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

PORTES, J. A. et al. In vitro treatment of *Toxoplasma gondii* with copper (II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. **Veterinary parasitology**, v. 245, p. 141-152, 2017.

PORTES, J. A. et al. Reduction of *Toxoplasma gondii* development due to inhibition of parasite antioxidant enzymes by a dinuclear iron (III) compound. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7374-7386, 2015.

PORTES, Juliana A. et al. Intracellular life of protozoan *Toxoplasma gondii*: Parasitophorous vacuole establishment and survival strategies. **Biocell**, v. 47, n. 4, 2023.

PORTES, Juliana de A. et al. A new iron (III) complex-containing sulfadiazine inhibits the proliferation and induces cystogenesis of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology research**, v. 117, p. 2795-2805, 2018.

PRINZ, William A.; TOULMAY, Alexandre; BALLA, Tamas. The functional universe of membrane contact sites. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 1, p. 7-24, 2020.

RAMAKRISHNAN, Srinivasan et al. The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* depends on the synthesis of long-chain and very long-chain unsaturated fatty acids not supplied by the host cell. **Molecular microbiology**, v. 97, n. 1, p. 64-76, 2015.

RAMÍREZ-MACÍAS, Inmaculada et al. Biological activity of three novel complexes with the ligand 5-methyl-1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidin-7 (4 H)-one against *Leishmania* spp. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 813-819, 2011.

REGGIORI, Fulvio; KLIONSKY, Daniel J. Autophagy in the eukaryotic cell. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 1, p. 11-21, 2002.

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

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

RODJAKOVIC, D.; SALM, L.; BELDI, G.; Função da conexina-43 em macrófagos. **Jornal internacional de ciências moleculares**. v. 22, n. 3, pág. 1412, 2021.

RODJAKOVIC, Daniel; SALM, Lilian; BELDI, Guido. Function of connexin-43 in macrophages. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 3, p. 1412, 2021.

RODJAKOVIC, Daniel; SALM, Lilian; BELDI, Guido. Function of connexin-43 in macrophages. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 3, p. 1412, 2021.

ROHLOFF, Peter *et al.* Calcium uptake and proton transport by acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18390, 2011.

ROMANO, Julia D. *et al.* The parasite *Toxoplasma* sequesters diverse Rab host vesicles within an intravacuolar network. **Journal of Cell Biology**, v. 216, n. 12, p. 4235-4254, 2017.

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

SABIN, Albert B.; OLITSKY, Peter K. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. **Science**, v. 85, n. 2205, p. 336-338, 1937.

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

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

Saéz, JC; Brañes, MC; Corvalán, LA; Eugenín, EA; González, H.; Martínez, AD & Palisson, F. (2000) Gap junctions in cells of the immune system:

structure, regulation and possible functional roles. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 447-455

SANKARAMOORTHY, Aravind; ROY, Sayon. High glucose-induced apoptosis is linked to mitochondrial connexin 43 level in RRECs: implications for diabetic retinopathy. *Cells*, v. 10, n. 11, p. 3102, 2021.

Scand. Sect. B 86:165–167.

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

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

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

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

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

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

SHAPIRO, Karen et al. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 15, p. e00049, 2019.

SHEN, Chen et al. Mtor-and sgk-mediated connexin 43 expression participates in lipopolysaccharide-stimulated macrophage migration through the inos/src/fak axis. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 10, p. 2986-2997, 2018)

SHIMURA, Daisuke; SHAW, Robin M. GJA1-20k e a dinâmica mitocondrial. **Fronteiras em Fisiologia** , p. 563, 2022.

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

SINGH, H. L.; SHARMA, M.; VARSHNEY, A. K. Studies on coordination compounds of organotin (IV) with schiff bases of amino acids. **Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 445-456, 2000.

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

SOLDATI, Dominique; DUBREMETZ, Jean Francois; LEBRUN, Maryse. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1293-1302, 2001.

SOMPAYRAC, L.M. **How the Immune System Works**. Ed. Seventh, 2022.

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

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

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

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

STUTZMANN, Grace E.; MATTSON, Mark P. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ handling in excitable cells in health and disease. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 3, p. 700-727, 2011.

TA, W.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. Origins and hallmarks of macrophages: development, homeostasis, and disease. **Nature**, v. 496, p. 445-455, 2013.

TA, Wynn; CHAWLA, A.; POLLARD, J. Origins and hallmarks of macrophages: development, homeostasis, and disease. **Nature**, v. 496, p. 445-455, 2013.

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

TALABANI, H. *et al.* Fatores de ocorrência de toxoplasmose ocular. Uma crítica. **Parasita**, v. 17, n. 3, p. 177-182, 2010.

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

TIKU, Varnesh; TAN, Man-Wah; DIKIC, Ivan. Mitochondrial functions in infection and immunity. **Trends in cell biology**, v. 30, n. 4, p. 263-275, 2020.

TITTARELLI, Andrés *et al.* Connexin-mediated signaling at the immunological synapse. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 10, p. 3736, 2020.

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

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

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

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

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

VENUGOPAL, Kannan *et al.* Rab11A regulates dense granule transport and secretion during *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and parasite replication. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 5, p. e1008106, 2020

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

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

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

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

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

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

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

WIEDEMANN, Nils; PFANNER, Nikolaus. Mitochondrial machineries for protein import and assembly. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 685-714, 2017.

Willecke, K; Eiberger, J; Degen, D; Eckardt, A.; Romunaldi, M; Gueldenagel, UD & Sohl, G. (2001) Structural and functional diversity

of connexin genes in the mouse and human genome. V.2001 15/11/2001.

WOLF, Abner; COWEN, David; PAIGE, Beryl H. Fetal encephalomyelitis: prenatal inception of infantile toxoplasmosis. **Science**, v. 93, n. 2423, p. 548-549, 1941.

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

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

YAMAMOTO, Masahiro *et al.* ATF6 β is a host cellular target of the Toxoplasma gondii virulence factor ROP18. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 7, p. 1533-1546, 2011.

YANG, W. *et al.* To TRIM the Immunity: From Innate to Adaptive Immunity. **Frontiers in immunology**. v. 11, n. 02157, 2020.

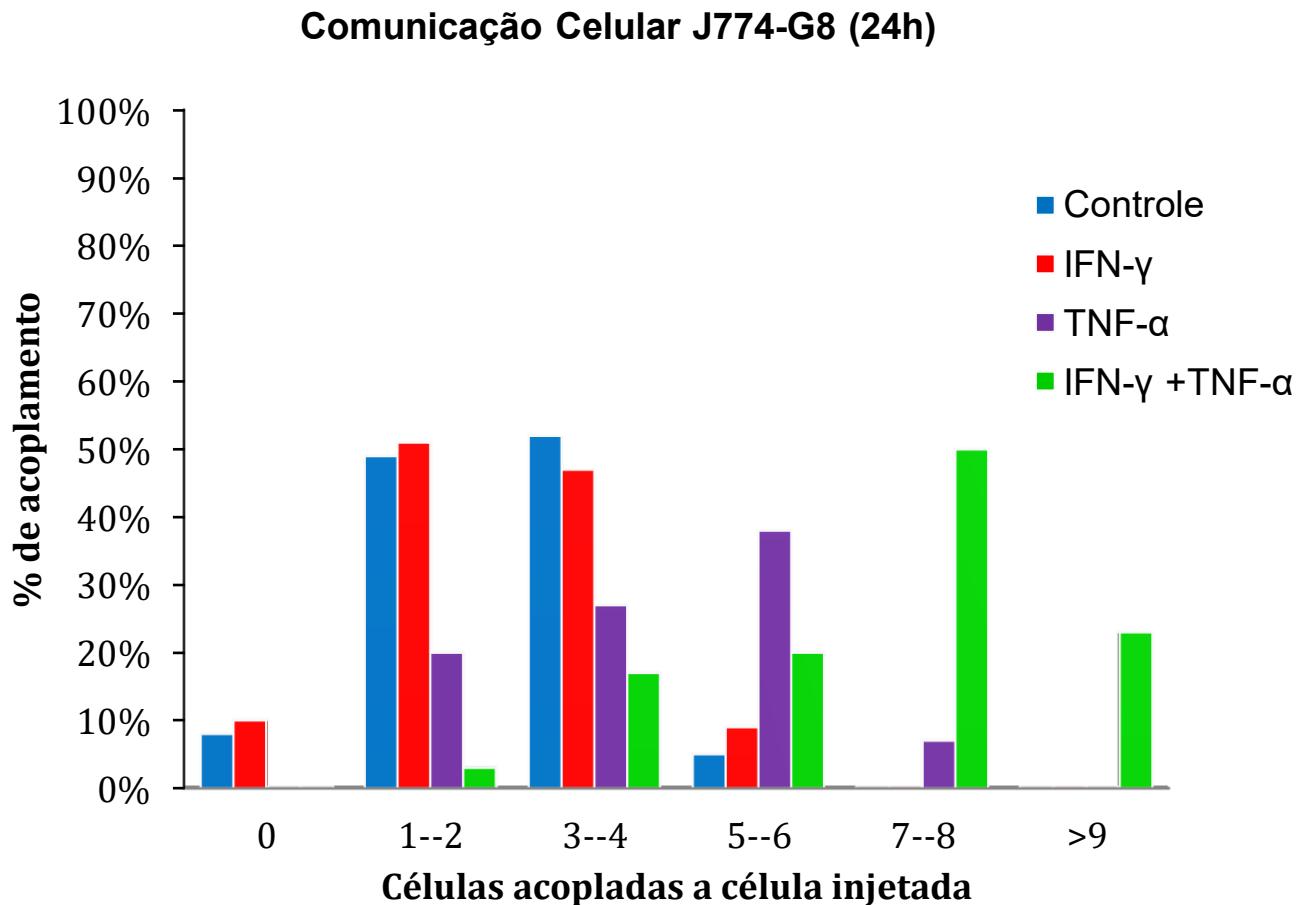
Yeager, M; Unger, VM & Falk, MM. (1998) Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels [published erratum appears in Curr Opin Struct Biol 1998 Dec; 8 (6): 810-11] *Curr Opin Struct Biol* 8, 517-24

ZHANG, Ruize *et al.* Hijacking of host mitochondria by Toxoplasma gondii and SARS-CoV-2. **Trends in Parasitology**, 2022.

ZUMERLE, Sara *et al.* Intercellular calcium signaling induced by ATP potentiates macrophage phagocytosis. **Cell reports**, v. 27, n. 1, p. 1-10. e4, 2019.

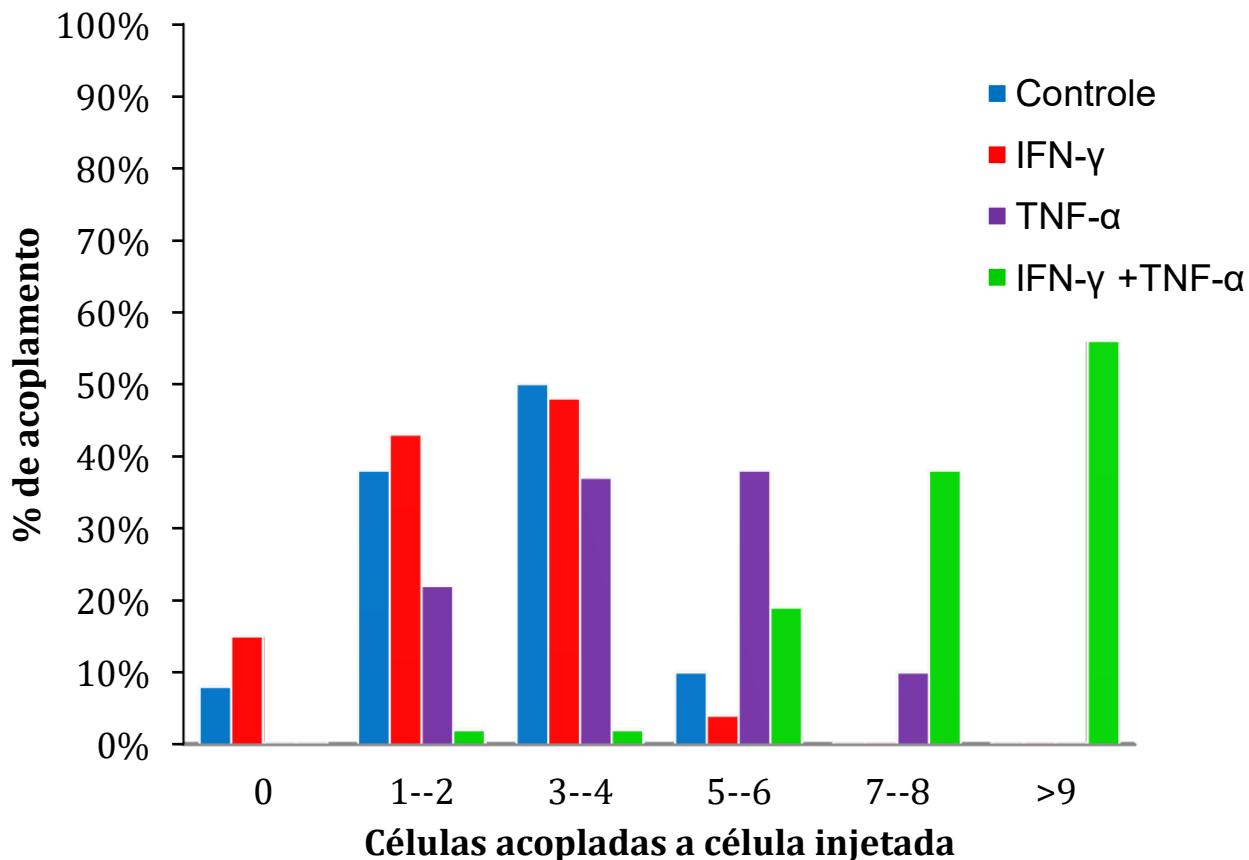
8. ANEXOS

8.1. Anexo 1



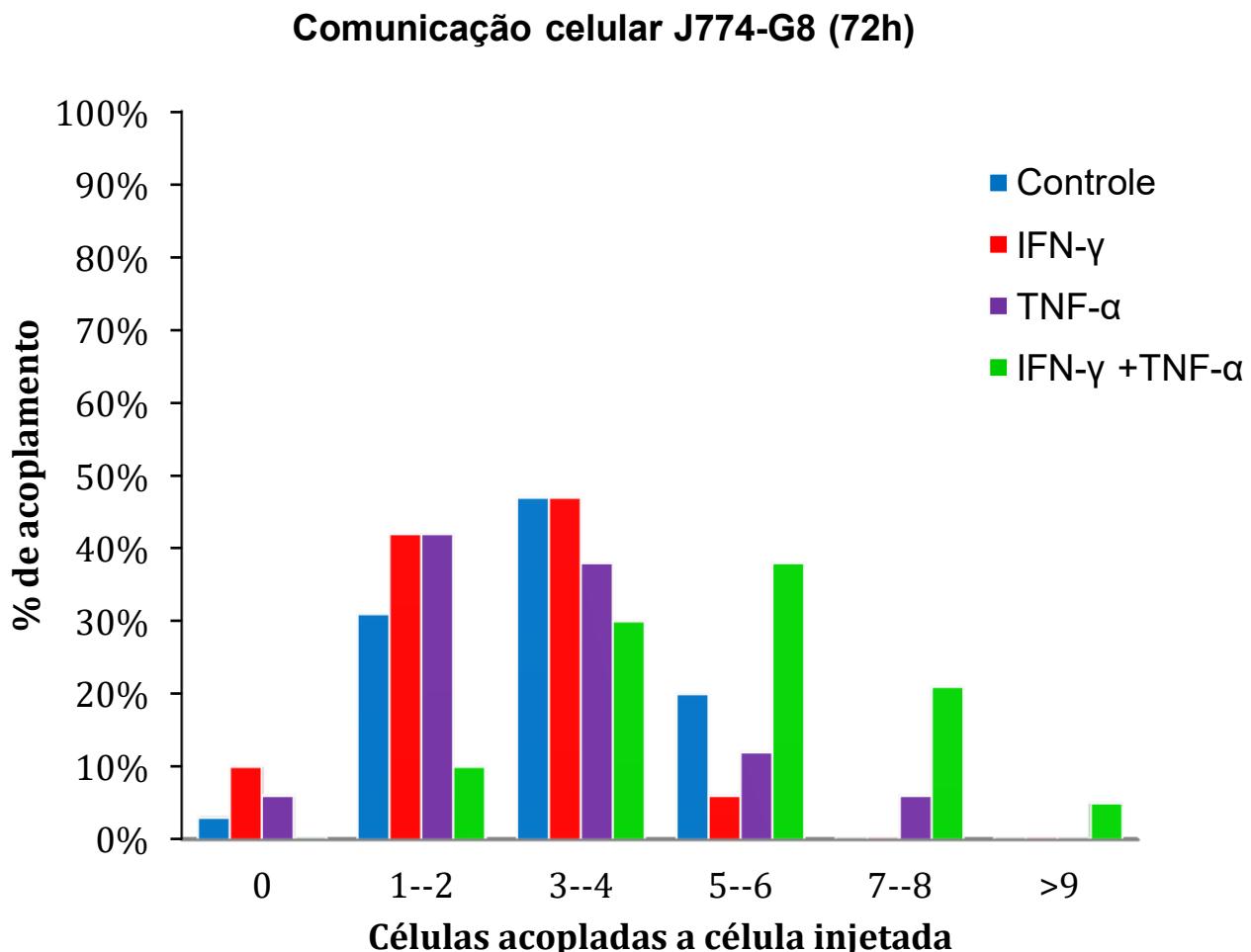
Anexo1: O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 controle ou incubadas por 24 horas com IFN- γ , TNF- α ou IFN- γ , TNF- α , injetadas com o corante “Lucifer Yellow”. As culturas foram injetadas com o corante fluorescente “Lucifer yellow”. O grau de acoplamento foi quantificado em seis classes: (0) nenhuma célula acoplada à célula injetada; (1---2) 1 à 2 células acopladas à célula injetada com o corante; (3---4) de 3 à 4 células acopladas à célula injetada; (5---6) 5 à 6 células acopladas à célula injetada; (7---8) 7 à 8 células acopladas à célula injetada; (>9) células acopladas à célula injetada. Um total de 90 células J774-G8 em cada uma das condições foi injetado, e mais de 20% das células tratadas injetadas incubadas IFN- γ , TNF- α estavam acopladas a mais de 10 células. Estatisticamente $p<0,05$ por χ^2 .

8.2. Anexo 2

Comunicação Celular J774-G8 (48h)

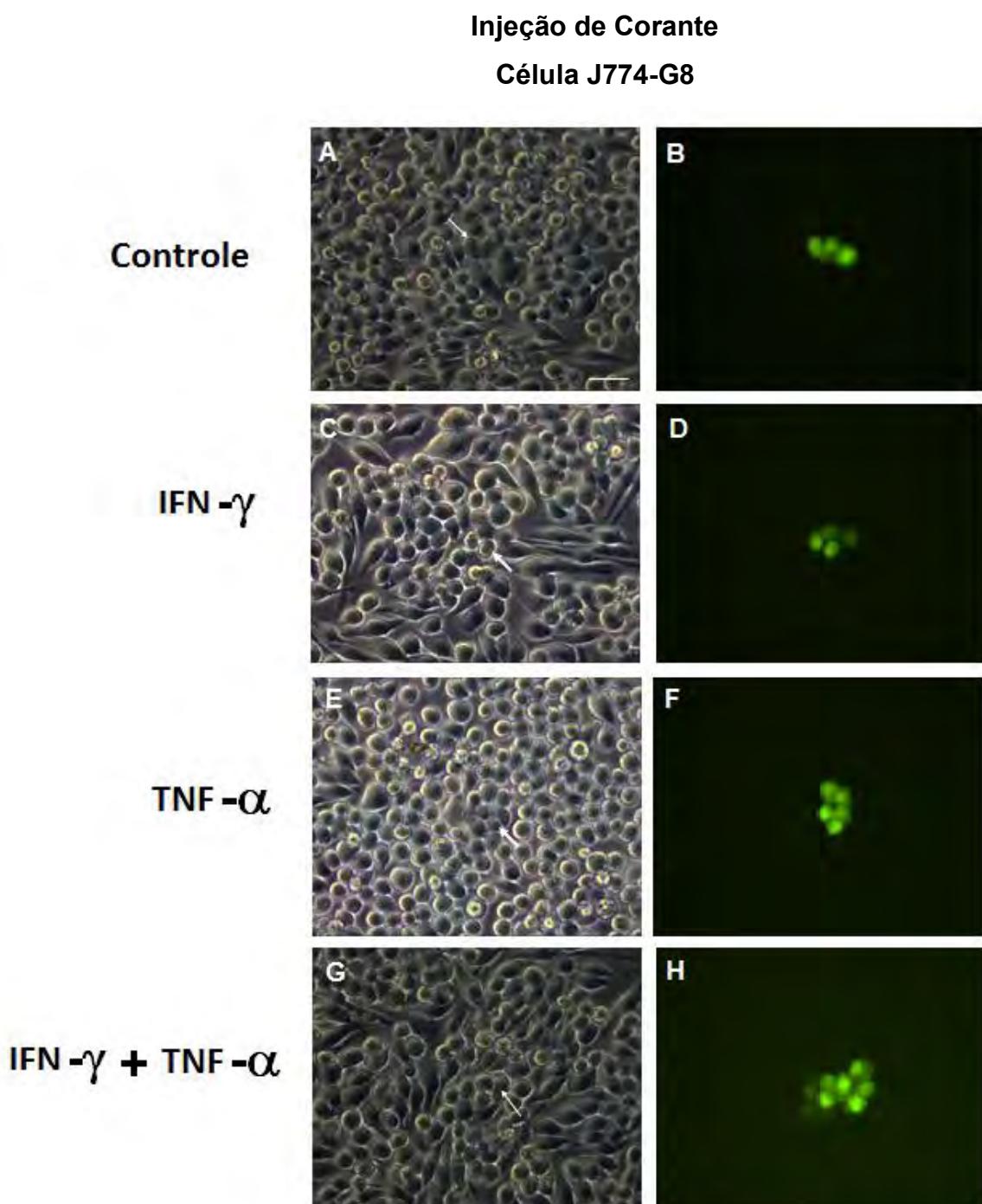
Anexo 2: O histograma ilustra o grau de acoplamento das células J774-G8 controle ou incubadas por 48 horas IFN-γ, TNF-α ou IFN-γ, TNF-α, injetadas com o corante “Lucifer Yellow”. As culturas foram injetadas com o corante fluorescente “Lucifer yellow”. O grau de acoplamento foi quantificado em seis classes: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

8.3. Anexo 3



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

8.4. Anexo 4



Anexo 4: 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 IFN- γ + TNF- α , injetadas com o corante “Lucifer Yellow”. Podemos observar que as células incubadas com os fatores de forma combinada (IFN- γ + TNF- α) 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: