LUCAS MARTINS CHAIBLE

Efeitos da deleção do gene Cx43 sobre o desenvolvimento fetal de
camundongos de diferentes backgrounds genéticos: ênfase na
osteogênese

São Paulo

2008

LUCAS MARTINS CHAIBLE

Efeitos da deleção do gene Cx43 sobre o desenvolvimento fetal de camundongos de diferentes backgrounds genéticos: ênfase na osteogênese.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2084
FMVZ

Chaible, Lucas Martins

Efeitos da deleção do gene Cx43 sobre o desenvolvimento fetal de camundongos de diferentes backgrounds genéticos: Ênfase na osteogênese / Lucas Martins Chaible. – São Paulo : L. M. Chaible, 2008.
105 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

1. Conexinas. 2. Desenvolvimento fetal. 3. Animais transgênicos.
4. Osteogênese. I. Título.

ERRATA

CHAIBLE, L. M. **Efeitos da deleção do gene Cx43 sobre o desenvolvimento fetal de camundongos de diferentes backgrounds genéticos:** Ênfase na osteogênese. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Capa	-	2	backgrounds genéticos: Ênfase na	<i>backgrounds</i> genéticos: Ênfase na
Página de rosto	-	2	backgrounds genéticos: Ênfase na	<i>backgrounds</i> genéticos: Ênfase na
Ficha catalográfica	2	2	backgrounds genéticos: Ênfase na	<i>backgrounds</i> genéticos: Ênfase na

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da deleção do gene Cx43 sobre o desenvolvimento fetal de camundongos de diferentes backgrounds genéticos", protocolado sob o nº1305/2008, utilizando 80 (oitenta) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 23 de abril de 2008.

We certify that the Research "Characterization of Cx43 gene deletion on embryogenesis in different mouse strains", protocol number 1305/2008, utilizing 80 (eighty) mice, under the responsibility Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/23/08.

São Paulo, 23 de abril de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Chaible, Lucas Martins

Título: Efeitos da deleção do gene Cx43 sobre o desenvolvimento fetal de camundongos de diferentes backgrounds genéticos: ênfase na osteogênese.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/____

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura: _____

Julgamento _____

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura: _____

Julgamento _____

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura: _____

Julgamento _____

À minha Família, pelo suporte, incentivo, dedicação e amor incondicional. Vocês fizeram que um gene se transformasse em proteína.

Em memória de meu pai, tenho certeza que ele ainda me guia.

“Não devemos exigir que a ciência nos revele a verdade. Num sentido corrente, a palavra verdade é uma concepção muito vasta e indefinida. Devemos compreender que só podemos visar a descoberta de realidades relativas. Além disso, no pensamento científico existe sempre um elemento poético. A compreensão de uma ciência, assim como apreciar uma boa música, requer em certa medida processos mentais idênticos. A divulgação da ciência é de grande importância se proceder de uma boa fonte. Ao procurar-se simplificar as coisas não se deve deformá-las. A vulgarização tem de ser fiel ao pensamento inicial. A ciência não pode, é evidente, significar o mesmo para toda a gente. Para nós, a ciência é em si mesma um fim, pois os homens da ciência são espíritos inquisidores. (...) a sociedade torna possível o trabalho dos sábios, alimenta-os. Tem, pois o direito de lhes pedir por seu lado uma alimentação digestiva...”

Albert Einstein 1879-1955

Agradecimentos

À minha orientadora, Maria Lúcia Zaidan Dagli, que me deixou voar com minhas próprias asas, mas sempre com um ninho seguro para voltar.

À minha mãe, tia, avó, irmãos e Gregor, que são a minha sustentação, minha família.

À minha namorada Bianca e sua família, pela compreensão nos momentos difíceis, risadas nos fáceis; mas sempre juntos de mim nessa jornada, inclusive nos incontáveis finais de semana de experimento.

À técnica do nosso laboratório Cyntia, pelos primeiros e segundos passos na Biologia Molecular, uma amiga e professora.

À técnica do nosso laboratório Marguite, pela amizade e cuidados.

Aos Professores e Funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

A todos os companheiros de trabalho e amigos do laboratório de Oncologia Experimental que proporcionaram momentos inesquecíveis.

Ao Bruno Cogliati e Daniel Sanches, mais que amigos, meus orientadores. Sem vocês esse trabalho não teria sido realizado.

Aos amigos Luciano e Claudío, pelos valiosos ensinamentos na arte da histologia e pelas conversas.

À médica veterinária Claudía Mori e à equipe do Biotério -FMVZ.

Aos animais utilizados no experimento, pela doação da vida em prol da pesquisa.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todos vocês, deixo o meu...

Muito Obrigado

RESUMO

CHAIBLE, L.M. **Efeitos da deleção do gene Cx43 sobre o desenvolvimento fetal de camundongos de diferentes backgrounds genéticos: Ênfase na osteogênese.** [Effects of Cx43 gene deletion on mouse fetal development in different genetics backgrounds: Emphasis in osteogenesis.]. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Conexinas são proteínas que compõem as junções comunicantes do tipo *gap*, e a diminuição na sua expressão tem sido relacionada com diversas alterações fisiológicas, entre elas algumas síndromes, malformações genéticas, o aumento da proliferação celular e a carcinogênese. Dentre as isoformas das conexinas presentes nos tecidos animais, a Cx43 é a mais abundante e a mais estudada, tendo a sua importância relatada *in vivo* em camundongos que tiveram um dos alelos de Cx43 deletado (Cx43^{+/-}), devido a morte desses animais logo após o nascimento devido a malformações cardíacas. Considerando o fato de esse gene ser expresso em dezenas de tipos celulares, tivemos como objetivo avaliar os outros tecidos em busca de anomalias ocorridas durante o desenvolvimento, e a possível interferência do *background* genético. Para isso acompanhamos dia-a-dia o último terço gestacional de camundongos de *background* C57BL/6 e CD1, avaliando histológica e morfológicamente os fetos em busca de anomalias nos animais Cx43^{+/-} e Cx43^{-/-} em relação aos animais Cx43^{+/+}. Exceto pelo tecido ósseo, não encontramos alterações nos órgãos que expressam esse gene, bem como alterações causadas pelo refluxo de sangue causado pela malformação da válvula tricúspide. Durante a osteogênese, por meio da avaliação das costelas e tíbia, percebemos um retardo no desenvolvimento, que se agrava conforme a deficiência do gene Cx43. Percebemos nitidamente que o processo de diferenciação celular ocorre de maneira menos eficiente, atrasando processos como deposição de colágeno e de matriz óssea. Conclui-se que a Cx43 é importante para o desenvolvimento ósseo na fase fetal em camundongos.

Palavras-chave: Conexinas. Desenvolvimento Fetal. Animais Transgênicos. Osteogênese.

ABSTRACT

CHAIBLE, L.M. **Effects of Cx43 gene deletion on mouse fetal development in different genetics backgrounds: Emphasis in osteogenesis.** [Efeitos da deleção do gene Cx43 sobre o desenvolvimento fetal de camundongos de diferentes backgrounds genéticos: Ênfase na osteogênese]. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Connexins are proteins that compose the gap junctions, and the reduction in its expression has been related with diverse physiological alterations, like some syndromes, malformations, the increase of the cellular proliferation and carcinogenesis. Among isoforms of the connexins in animal cells, the Cx43 is the most abundant and studied, having its importance been shown up in alive mice that had one allele of Cx43 (Cx43^{+/-}) deleted. REAUME et al. related that Cx43^{-/-} mice presented cardiac malformation and died immediately after birth. Considering the fact that this gene is expressed in many cell types, we evaluate the possibility of other tissues also to present alterations during the fetal development. Due to this, we studied the mouse development initiating in 12.5 to 19.5 DE (embryologic day) and evaluated the histology of C57BL/6 and CD1 mice searching for anomalies of Cx43^{+/-} and Cx43^{-/-} mice in relation to the Cx43^{+/+} animals. We did not find alterations in the main organs that express Cx43, nor alterations due to blood out flow related to cardiac malformations. We only found significant difference was the bones; through the evaluation of the ribs and tibia. It has been observed a delay in the development, that was more important in Cx43 knockout mice. We observed clearly that the process of cellular differentiation occurs in less efficient way, delaying processes as deposition of collagen and bone matrix. In conclusion, this study showed that Cx43 is important for bone development in mice.

Keywords: Connexin. Fetal Development. Transgenic mouse. Osteogenesis.

TERMOS EM INGLÊS

Background = constituição genética.

cDNA = fita de ácido desoxirribonucleico complementar a ácido ribonucleico que contém a mensagem que codifica para determinada proteína.

Crow-hump = Medição realizada nos fetos, eixo imaginário que liga a nuca à inserção da cauda.

DE = dia embrionário do feto, refere-se ao período de desenvolvimento que o animal se encontra na data estudada.

DNA = ácido desoxirribonucleico

Foward = *primer* que é lido pela Taq polimerase no sentido 5'-3' da fita de DNA senso.

Gap junction = junções comunicantes do tipo gap, ou hiato.

GenBank = banco de dados públicos onde estão contidos as seqüências genômicas de várias espécies.

GJIC = comunicação intercelular através de junções do tipo gap

Immunoblot = identificação das proteínas por anticorpos específicos após eletroforese e transferência para membrana.

Knockout (KO) = animais geneticamente manipulados em que determinado(s) gene(s) é (são) anulado(s) por vários métodos.

Loops = alças da molécula de DNA ou no caso das conexinas, se refere às alças extras e intracelulares que se dobram conectando cada domínio transmembrana.

mRNA = ácido ribonucleico cuja informação que codifica para uma determinada proteína estão contidos.

Overnight = período de tempo correspondente há uma noite.

PCR = reação de polimerização em cadeia.

Primer = É uma sequência de geralmente 20 bp que é ponto inicial de reconhecimento pela polimerase na duplicação do DNA senso.

Probe = nome dado a seqüências de oligonucleotídeos que contém os fluoróforos utilizados em técnicas de biologia molecular como hibridização *in situ* e no PCR em tempo real.

Reverse = primer que é lido Taq polimerase no sentido 5'-3' da fita de DNA anti-senso, mas que na fita senso seria lido no sentido 3'-5'.

RNA = ácido ribonucléico.

RT-PCR = reação de polimerização em cadeia a partir de RNA, utilizando a enzima transcriptase reversa.

Splicing = união dos éxons do pré-mRNA e exclusão dos íntrons originando o mRNA maduro.

5'-UTR: Região 5' do gene não traduzida em proteína.

Western blot = método para identificação de proteínas, baseado em extração, eletrofoese, transferência e identificação através de anticorpos e sistema de revelação.

Wild-type (WT)= gene normal, presente no genoma de determinada espécie, é o camundongo selvagem.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 AS JUNÇÕES COMUNICANTES DO TIPO GAP	18
2.2 AS CONEXINAS NA GAMETOGÊNESE.....	22
2.3 OS PRIMEIROS SINAIS DAS CONEXINAS NO EMBRIÃO	26
2.4 AS CONEXINAS NO EMBRIÃO.....	29
2.5 AS CONEXINAS NO FETO	33
2.6 AS CONEXINAS NO TECIDO ÓSSEO.....	38
2.7 O GENE Cx43.....	42
2.8 CAMUNDONGOS <i>KNOCKOUTS</i> PARA Cx43.....	44
3 OBJETIVOS	46
3.1 OBJETIVO GERAL.....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 OS ANIMAIS	47
4.2 MATRIZES CD1 E C57BL/6	48
4.3 OBTENÇÃO DOS FETOS.	49
4.4 EXTRAÇÃO DO DNA DAS MATRIZES E FETOS.	50
4.5 GENOTIPAGEM	51
4.6 PROCESSAMENTO PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	53
4.7 COLORAÇÕES	55
4.7.1 Hematoxilina-Eosina	55
4.7.2 Picrosirius	57
4.7.3 Von Kossa-Alcian Blue.....	59
4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA CONEXINAS 45.....	61

4.9 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO	62
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5 RESULTADOS.....	64
5.1 OS ANIMAIS	64
5.2 EVOLUÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FETAL	66
5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS FETOS	69
5.4 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO.	70
5.4.1 Fetos de 15.5 DE	71
5.4.2 Fetos de 16.5 DE	73
5.4.3 Fetos de 17 DE.	75
5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO ÓSSEO	77
5.6 ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO.....	88
5.7 ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO DE MATRIZ ÓSSEA	90
5.8 DETECÇÃO DA CX45 NA OSTEOGÊNESE.....	95
6 DISCUSSÃO	97
7 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

Nos organismos multicelulares, as células encontram-se organizadas em tecidos e necessitam estar em contato com as demais para originar grupos cooperativos, que por sua vez estão associados em várias combinações, formando os órgãos. A membrana plasmática é a estrutura celular responsável por esse contato íntimo entre as células vizinhas, portanto, é previsível que esta abrigue diversos tipos de proteínas e estruturas que participem desse contato.

São descritas três tipos distintos de junções celulares, classificadas de acordo com a principal função que desempenham (ALBERTS, et al. 1994). As junções de ancoramento promovem a adesão de uma célula à outra ou a elementos da matriz extracelular; as junções de oclusão são responsáveis pela restrição da passagem de substâncias no espaço intercelular; e as junções comunicantes do tipo GAP, que se organizam formando canais ligando os citoplasmas de duas células vizinhas, permitindo a passagem de substâncias entre as células. Esse último tipo de junção será muito bem discutido neste trabalho.

A necessidade de “diálogo” celular nos tecidos é de extrema importância em diversos estados fisiológicos para sua coordenação e organização. Essa troca de informações entre as células pode ocorrer através de moléculas sinalizadoras, como no caso de hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento, caracterizando uma comunicação indireta. Em outros casos, a comunicação pode ocorrer através de pequenas moléculas hidrofílicas que transitam diretamente de uma célula vizinha para outra, promovendo a difusão de sinalizadores como íons cálcio e inositol através de canais formados na membrana plasmática.

Essa comunicação direta é feita através de um grupo de proteínas denominadas *conexinas*, onde a união de seis unidades dessas origina uma estrutura conhecida como *conexon*. *Conexons* de duas células adjacentes se unem, formando um verdadeiro túnel por onde passam inúmeras moléculas, sejam elas com carga elétrica ou não, de dimensões compatíveis com o tamanho do canal. Esses canais possuem baixa seletividade, permitindo, de maneira geral, o trânsito livre de moléculas de até 1200Da.

A grande maioria das células animais utiliza a rede de comunicação organizada pelas *conexinas*. As exceções são os eritrócitos, espermatozóides e células musculares esqueléticas. Essas proteínas são tão importantes na coordenação tecidual que são expressas logo nas primeiras clivagens do embrião, controlando os processos de diferenciação celular logo no início da fase embrionária (DAVIES, 1996; HOUGHTON, 2002).

A Cx43 é a mais abundante em células de mamíferos, sendo, conseqüentemente, a mais estudada (YANCEY, 1989; DAGLI, 2004). É expressa em várias células, como nos pneumócitos do tipo II, células ovais hepáticas, endotélio de vasos sanguíneos, miocárdio, fibras de Purkinje, osteoblastos, osteócitos, condrócitos, monócitos, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos, queratinócitos, células de Leydig, mioepitélio mamário, células foliculares da tireóide, células trofoblásticas gigantes, citotrofoblastos e sinciciotrofoblastos.

Em camundongos, a Cx43 inicia sua expressão na fase de 4 células do embrião, ou seja, logo após sua ativação genômica. Dessa maneira, participa do desenvolvimento embrionário do coração (YA, 1998), na difusão do impulso elétrico no miocárdio (GROS, 1996), no processo de diferenciação das células formadoras da placenta (FRENDON, 2003), na adesão ao epitélio uterino (PFARRER, 2004) e no desenvolvimento do tecido ósseo (LECANDA, 2000).

Reaume et al. (1995) inativaram o gene da conexina 43 em camundongos, utilizando o princípio da recombinação homóloga. Os autores observaram que os animais que não expressavam o gene (Cx43^{-/-}) morriam algumas horas após o nascimento devido problemas de malformação cardíaca, sendo assim incompatível com a vida. Alguns anos depois, Ya et al. (1998) estudaram as alterações no desenvolvimento cardíaco em fetos de camundongos C57BL/6 com a mesma deleção e concluíram que o átrio direito apresenta um atraso no desenvolvimento, resultando na dilatação da câmara e malformação da válvula tricúspide, ocasionando a morte do animal algumas horas após o nascimento.

Depois de tantos estudos relatando os problemas cardíacos causados pela deleção total do gene da Cx43, observamos uma lacuna nos conhecimentos sobre essa proteína: Existem alterações no desenvolvimento desses animais, além dos descritos? Como dito a Cx43 é amplamente expressa nos órgãos e em diversos tipos celulares, portanto, quais são os efeitos da sua ausência durante o desenvolvimento embrionário e fetal destes animais? As linhagens respondem à ausência da Cx43 de forma diferente?

Essas foram algumas das perguntas que incentivaram a realização deste trabalho, no qual acompanhamos o último terço de desenvolvimento fetal em camundongos das linhagens C57BL/6 e CD1. Por meio de análise histológica investigamos todos os tecidos em busca de possíveis alterações e, após os primeiros resultados, nos aprofundamos naqueles que consideramos mais promissores.

Sem dúvida o tecido que nos despertou maior interesse, devido à intensidade e extensão das anomalias no desenvolvimento, foi o ósseo. Como discutiremos adiante, há relatos na literatura provenientes da observação desse fenômeno *in vitro*, que dizem ocorrer

um atraso no processo de ossificação em animais com deficiência parcial e total do gene Cx43. Até hoje nenhum autor relatou os acontecimentos histológicos dia-a-dia na osteogênese nesses animais *knockouts*.

Nós confirmamos esse atraso na ossificação e aprofundamos e percebemos que o atraso ocorre devido problemas na diferenciação celular de osteoblastos e osteócitos, reduzindo a deposição de matriz colagenosa e óssea.

Nas próximas páginas seguirão em detalhes as funções fisiológicas das conexinas, bem como o apanhado da literatura sobre o assunto, dando embasamento ao leitor entender os resultados obtidos nessa dissertação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AS JUNÇÕES COMUNICANTES DO TIPO GAP

As junções comunicantes do tipo gap (*Gap Junctional Intercellular Communication* GJIC) foram descritas pela primeira vez no final dos anos 60. O termo “junção comunicante do tipo *gap*” é utilizado com a finalidade de descrever regiões especializadas das membranas plasmáticas de duas células adjacentes que se reaproximam sem se fundir, delimitando um espaço intermembranas ou “gap” estimado em 2-3 nm. A observação em microscópio eletrônico mostrou que as GJIC apresentam dispostas na forma de placas, formando assim regiões de comunicações.

Essas regiões ricas em comunicação foi definida por Makowski et al. (1977), caracterizando um modelo que ainda é atual, em que cada placa é composta por vários canais intercelulares constituído pela associação de estruturas hexaméricas de 7 nm de diâmetro chamadas de **conexons** (Figura 1A. Detalhe em círculo vermelho). Cada conexon é constituído de seis subunidades protéicas que atravessam a membrana: as **conexinas** (Cx), que quando oligomerizadas formam um poro central hidrofílico de cerca de 2 nm de diâmetro (Figura 1B).

Figura 1- **A** Modelo de organização da placa juncional proposta por Makowski et al. (1977) estabelecida a partir de estudos de microscopia eletrônica e de estudos de difração de raios X de junções gap no fígado de camundongos. Cada **conexon** (círculo vermelho) é formado por seis subunidades de **conexinas** (representadas em amarelo/azul) delimitando um poro central (em rosa) e está estritamente associado a outro conexon na membrana adjacente (retângulo verde). **B** Estrutura transmembranar da conexina: E1 e E2 alças extracelulares; CL alça intracitoplasmática; M domínios transmembranar.

A nomenclatura correntemente utilizada e aceita pela comunidade científica faz referência ao tamanho da proteína (em kDa), precedida do termo genérico Cx (BEYER et al., 1987). Em certos casos, algumas conexinas identificadas apresentam massas moleculares muito próximas, sendo necessário o emprego de um número decimal: é o caso para diferenciar a conexina 31 da conexina 31.1 (HENNEMANN et al., 1992; WILLECKE et al., 1991).

Existe ainda uma nomenclatura alternativa, que é baseada na análise filogenética das diferentes conexinas, isto é, baseada nas homologias das seqüências de nucleotídeos (KUMAR; GILULA, 1992). Esta classificação agrupa todas as conexinas em três grupos distintos: grupos α , β e γ conforme ilustrado na figura 2. Nesta nomenclatura, cada Cx é nomeada pelo desígnio Gj (*Gap Junction*), identificada pela classe na qual ela pertence (α , β ou γ), seguido do número da ordem de sua identificação. Por exemplo, a Cx43 aparece na classe α e foi a primeira conexina identificada nesta classe, assim, ela também pode ser identificada como Gj α 1 (BENNETT et al., 1991; O'BRIEN et al., 1998).

Figura 2- Divisões filogenéticas das diferentes isoformas das conexinas (Cx), de acordo com a classe. Família multigênica derivada de um ancestral comum. Adaptado de AVANZO (2004).

A grande maioria das células animais utiliza a rede de comunicação feita pelas conexinas, com exceções dos eritrócitos, espermatozóides e células musculares esqueléticas. Segundo Willecke et al. (2002) foram identificadas 19 isoformas, estando todas amplamente distribuídas pelos tecidos. A Tabela 1 relaciona as principais conexinas com seus locais de expressão em mamíferos.

<i>Conexina</i>	<i>Célula</i>
Cx26	Hepatócitos, Células secretoras das glândulas endócrinas e exócrinas, Determinados queratinócitos, Determinadas células epiteliais
Cx30	Cérebro e Queratinócitos
Cx30.3	Células dos blastocistos; Determinados queratinócitos
Cx31	Determinados queratinócitos; Células dos blastocistos; Células da trofoectoderme placentária; Rins
Cx32	Maioria dos epitélios; Hepatócitos; células secretoras das glândulas exócrinas; epitélio folicular da tireóide; Rins; Determinados neurônios; Oligodendrócitos; Células de Schwann
Cx33	Algumas células do testículo
Cx36	Neurônios
Cx37	Determinadas células endoteliais; Determinados queratinócitos; Células musculares cardíacas; Estômago; Testículo; Ovário;
Cx40	Determinadas células endoteliais; Célula dos blastócitos; Células do sistema de condução cardíaca;
Cx43	Epitélio do cristalino e da córnea; Osteócitos; Astrócitos; Leptomeninges; Leucócitos; Macrófagos; Células musculares cardíacas; Trofoblastos; Células musculares lisas; Células secretoras das glândulas endócrinas; células β pancreáticas; células de Leydig; células de Sertoli; células tireoidianas; Determinados queratinócitos; Blastócitos; Fibroblastos.
Cx45	Células Musculares cardíacas; Células dos blastócitos; Células epiteliais do pulmão, dos rins, do intestino; do cérebro; Determinados queratinócitos; Osteócitos
Cx46	Fibras do cristalino; Células musculares; Células de Schwann; Coração; Rins; Osteócitos
Cx49	Cristalino
Cx50	Fibras do cristalino e córnea
Cx57	Coração, pulmão, Pele, Rins, Ovários, Testículos, Intestino
Cx60	Teca interna e células cúmulos no ovário. Cólon, Timos, Baço

Quadro 1- Relação das principais conexinas conhecidas em mamíferos e seus locais de expressão. Adaptado de AVANZO, 2004

Muitas células expressam mais de um tipo de Cx, formando *conexons* com constituições diferentes e características próprias. Como demonstra a figura 3, um *conexon* é homomérico se composto de um único tipo de conexina ou que ele é heteromérico se ele é composto por diferentes tipos de conexinas. Por sua vez, os canais intercelulares podem ser constituídos a partir de combinações diferentes de *conexons* homoméricos ou heteroméricos. A associação de dois *conexons* idênticos leva a formação de um canal homotípico enquanto que o alinhamento de dois *conexons* diferentes forma um canal heterotípico.

A existência de *conexons* heteroméricos foi observada *in vitro* e confirmada *in vivo*. Diferentes combinações foram descritas: Cx32/Cx26 no fígado (DIEZ et al. 1999) e na glândula mamária (BERTHOUD et al., 2000), Cx40/Cx43 no músculo liso (HE et al., 1999). Ou ainda Cx45.6/Cx50 no cristalino (JIANG; GOODENOUGH, 1996). Hoje em dia, a

existência in vivo de canais heterotípicos formados de conexons heteroméricos ainda não foi demonstrado.

Figura 3- Ilustração das possibilidades de arranjos entre duas conexinas na formação dos conexons e dos conexons em um canal comunicante.

Conexons homoméricos formados pela Cx43 permitem a passagem de moléculas de até 1.2 KDa, preferencialmente de carga negativa. Por esses canais, moléculas como cAMP, derivados do inositol trifosfato (IP3) e Ca^{2+} , passam livremente por citoplasmas de células adjacentes. Os canais formados pela Cx45 por outro lado, possuem um poro de menor tamanho se comparado com a Cx43, o que altera o perfil de moléculas beneficiadas, permite a passagem de moléculas de até 0.3 KDa, preferencialmente de carga positiva (NIESSEN, 2000; STAINS, 2005).

Algumas células como os osteoblastos possuem canais heteroméricos compostos por Cx43/Cx45. Nessas estruturas, as características da Cx45 sobrepõem a da Cx43, permitindo a passagem de moléculas menores que os canais homoméricos da Cx43 (KOVAL, 1995; MORENO, 1995; MARTINEZ, 2002).

2.2 AS CONEXINAS NA GAMETOGENÊSE.

As junções do tipo *gap* se mostram importantes antes mesmo da fecundação do oócito. Durante o desenvolvimento do folículo e maturação do gameta feminino, as conexinas estão presentes no complexo cúmulo-oócito, facilitando a passagem de sinalizadores e coordenando a diferenciação dessas células. No folículo ovariano de roedoras estão presentes as isoformas Cx26, Cx32, Cx37, Cx43 e Cx45, sendo a Cx43 a mais abundante nas células da granulosa, com expressão aumentada em resposta ao hormônio folículo estimulante (*Follicle-stimulating hormone*, FSH), e diminuída na presença do hormônio luteinizante (*Luteinizing hormone*, LH) (WIESEN, 1993; BEVANS, 1998; SIMON, 2006).

A Cx37 facilita o diálogo da zona pelúcida com o oócito e também possui sua expressão alterada conforme o estágio de desenvolvimento do folículo (KIDDER & MHAWI, 2002). A disposição das conexinas está ilustrada na figura 4.

Figura 4- Ilustração esquemática da disposição das conexinas no folículo ovariano de fêmeas de camundongos. A Cx37 é encontrada somente na zona pelúcida, comunicando-se com a membrana do oócito; a Cx43 é encontrada nas células do cúmulo. Nas projeções transzonais das células do cúmulo com oócito a Cx37 faz ligações heterotípicas com a Cx43 (seta vermelha) (SIMON, 2006; KIDDER & MHAWI, 2002).

A importância da proteína Cx43 no desenvolvimento folicular é evidenciada em trabalhos realizados utilizando animais *knockouts* para esse gene. Observa-se que os animais Cx43^{-/-} possuem um atraso acentuado na maturação do folículo, muito provavelmente pela

difficuldade da dissipação da sinalização celular causada pela ausência dos canais. Através da figura 5 a visualização desse atraso fica evidente (KIDDER & MHAWI, 2002)

Figura 5- Foliculogênese anormal em ovários de fêmeas com deleção do gene Cx43. Devido os animais Cx43^{-/-} morrerem logo após o nascimento, os ovários de fêmeas com 19 dias de gestação foram transplantados para outros animais para que o órgão continuasse do desenvolvimento. Após 3 semanas os ovários foram retirados e os folículos cultivados *in vitro*. Folículos cultivados, de mesma idade, foram comparados; nos que possuem a ausência da Cx43, o folículo se encontra na fase pré-antral, refletindo a falha da expansão das células da granulosa; enquanto os animais com expressão normal do gene se desenvolveram de maneira normal (ACKERT, 2001)

O hormônio FSH, ao ligar-se com seus receptores, aumenta o cAMP intracelular através da Adenil ciclase, desencadeando a cascata de transdução do sinal por todas as células. Segundo Ackert et al (2001), o motivo mais provável pela incapacidade de crescimento e diferenciação das células da granulosa e, por conseqüência, o não desenvolvimento do folículo, é causado pela dificuldade da disseminação do cAMP nas célula Cx43^{-/-} (BEVANS, 1998).

Ao contrário dos animais Cx43^{-/-}, os animais com deleção total do gene Cx37 sobrevivem ao desenvolvimento fetal e são adultos viáveis. Estudos feitos com animais Cx37^{-/-} demonstraram que as fêmeas são inférteis devido a incapacidade de seus folículos se desenvolverem após a fase pré-antral. Os folículos são recrutados normalmente mas ocorrem falhas em seu crescimento e desenvolvimento, entrando em atresia e formando estruturas similares ao corpo lúteo (SIMON, 1997).

O espermatozóide é uma das poucas células que, até hoje, não foram encontradas conexinas. Apesar desse fato, essas proteínas afetam diretamente a produção dos espermatozóides, pois são encontradas no tecido testicular, como nas células de Leydig,

espermatogônias e células de Sertoli. A relação das conexinas encontradas nas células do tecido testicular de camundongos, bem como o modo de detecção utilizado, está descrito na Tabela 2.

Conexina	Tipo de célula testicular	Modo de detecção
Cx26	Espermatócito e Espermátides Compartimento apical dos túbulos seminíferos	RT-PCR IH
Cx30.2	Células de Leydig e endotélio	IH
Cx32	Espermatócitos, Espermátides e células de Sertoli Compartimento apical dos túbulos seminíferos	RT-PCR IH
Cx33	Células de Sertoli Espermatócito e Espermátides	WB e IH RT-PCR
Cx43	Células de Sertoli e de Leydig Células peritubulares	IH e RT-PCR IH e RT-PCR

Quadro 2- Relação das diversas conexinas encontradas nos tecidos testiculares de camundongo e as técnicas de identificação. RT-PCR: *Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction*; IH: Imunohistoquímica; WB: *Western Blot*. As técnicas relacionadas se referem à molécula encontrada, mRNA ou proteína (POINTIS, 2005)

Através do estudo de animais *knockouts* (KO), é possível verificar a importâncias dessas proteínas na espermatogênese. Alguns animais, apesar da deleção do gene de determinada conexina, apresentam o processo normal de desenvolvimento do espermatozóide, com fertilidade normal. É o caso dos animais KO Cx31 (PLUM, 2001), KO Cx32 (NELLES, 2006), KO Cx37 (SIMON, 1997), KO Cx46 (GONG, 1997), KO Cx47 (ODERMATT, 2003) e KO Cx50 (WHITE, 1998).

A deleção completa do gene da Cx43 acarreta na falha do desenvolvimento do testículo ainda na fase fetal e também na adulta. Esta proteína promove a comunicação entre as células de Sertoli, entre essas células e espermatogônias ou espermatócitos imaturos. Sua expressão é alterada conforme o nível de FSH, variando a permeabilidade da membrana e regulando a passagem de íons Ca^{++} , essenciais para a transdução de sinais via cAMP. Dessa forma, a ausência da Cx43 acarreta uma comunicação deficiente, impossibilitando que a célula receba a sinalização de moléculas importantes para seu desenvolvimento normal (POINTIS, 2005).

Alguns trabalhos indicam que a Cx43 participa ativamente na regulação da espermatogênese: (1) Formação de contatos entre as células de Sertoli e células germinativas em proliferação através da Cx43 sugere sua participação em etapas específicas da espermatogênese (DECROUY, 2004); (2) Os níveis de Cx43 no túbulo seminífero são reduzidos ou praticamente inexistentes em animais mutantes que não apresentam espermatogênese (BATIAS, 1999); (3) A expressão da Cx43 está fortemente associada com o desenvolvimento das células germinativas dos túbulos seminíferos (BATIAS, 1999; RISLEY, 1992).

Alguns camundongos tiveram o gene da Cx43 deletado somente nas células de Sertoli através do sistema Cre-loxP, assim as demais células eram normais, evitando a letalidade fetal. Esses animais SC-Cx43 KO foram estudados para o melhor entendimento dessa proteína na espermatogênese e desenvolvimento do testículo, concluindo que: (1) A Cx43 está envolvida no controle de proliferação e maturação das células de Sertoli, figura 6; (2) Os efeitos encontrados não são nas mudanças sistêmicas, que por consequência afetaria a proliferação dessas células, mas sim diretamente em genes que regulam especificamente a divisão celular das células de Sertoli (SRIDHARAN, 2007)

Figura 6- Comparação dos testículos de camundongos de mesma idade. A redução do tamanho testicular do animal SC-Cx43 KO é facilmente percebida quando comparada com o animal normal. A diferença é devido problemas na proliferação e diferenciação celular. Barra de escala: 1mm (SRIDHARAN, 2007).

2.3 OS PRIMEIROS SINAIS DAS CONEXINAS NO EMBRIÃO

Durante os primeiros estágios do desenvolvimento animal, o zigoto ainda é uma pequena massa celular não compactada, formado por poucas células totipotentes, as quais se movem livremente dentro da área delimitada pela zona pelúcida (FINK, 1991). Essa morfologia apenas será alterada depois das primeiras clivagens, pois genes e proteínas relacionados com a adesão e comunicação celular serão ativados, formando uma massa compacta, dando origem às primeiras alterações embrionárias, entre elas a formação do trofoblasto e da massa celular interna (DAMSKY, 1993).

Segundo Prather e First (1988), embriões de camundongos iniciam a transcrição de seu DNA genômico 18 horas após a fecundação, ainda no estágio de duas células. A compactação ocorre no estágio de 8 células (48h) e chegam ao útero 60 horas depois da fecundação, possuindo 16 células. A fase de blastocisto é alcançada com 78 horas, eclodindo da zona pelúcida poucas horas depois, pronto para prosseguir com a implantação.

As proteínas responsáveis pelas junções do tipo *gap*, as conexinas, estão presentes logo após a ativação genômica do animal, sendo que algumas como a Cx31 e Cx43 possuem mRNA antes mesmo dessa fase. (BLOOR, 2004). A proteína Cx43 em particular é encontrada no citoplasma na fase de 4 células e, no estágio seguinte, já na membrana plasmática dos blastômeros (DE SOUSA, 1993).

Até a fase pré-implantação do embrião foram detectados transcritos de 8 isoformas de conexinas, sendo que das Cx26, Cx31, Cx31.1, Cx43, Cx45 foram identificadas proteínas funcionais, formando junções comunicantes entre as células. Dessas 8 isoformas identificadas, somente a Cx31 e Cx43 são amplamente encontradas no embrião, tanto nos trofoblastos quanto na massa celular interna (BLOOR, 2004).

A Cx43 é sem dúvida isoforma mais abundante encontrada no embrião, facilitando a comunicação entre as células na massa celular interna e dos trofoblastos. Sua presença é detectada no estágio de 4 células e cada vez mais abundante nas células, como ilustrado na figura 7.

Figura 7- Através da microscopia confocal é possível observar a marcação por Imunohistoquímica para Cx43 em embriões de camundongos de diversas idades. (A) embrião no estágio de 4 células; as setas indicam as marcações, visivelmente localizadas no citoplasma dos blastômeros. (B) Embrião no estágio de 8 células, iniciando a sua compactação; as setas cheias indicam as placas junccionais em que a Cx43 está presente, enquanto as setas vazias indicam as proteínas ainda no citoplasma, notadamente mais difusas que na situação A. (C) Embrião no estágio de Mórula, com a Cx43 amplamente distribuída. (D) Embrião em estágio de Blastocisto; a Cx43 está presente tanto na massa celular interna (ICM) quanto no trofoblasto (T). bl: blastocelo (DE SOUSA, 1993).

A Cx43 tem um papel fundamental no desenvolvimento do embrião, seja na compactação, na coordenação da diferenciação de células da massa celular interna e do trofoblasto ou na implantação uterina (DE SOUSA, 1993; VALDIMARSSON & KIDDER, 1995).

Devido sua grande importância no desenvolvimento embrionários, era de se esperar que os embriões com deleção do gene da Cx43 tivessem insucesso no desenvolvimento e morte ainda nessa fase. No entanto, eles conseguem se desenvolver de maneira “normal”, morrendo apenas após o nascimento devido problemas cardíacos (REAUME, 1995; YA, 1998). Na ausência da Cx43, ocorre uma compensação na comunicação intercelular por outras isoformas das conexinas, tais como Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx40 e Cx45, favorecendo o desenvolvimento do animal (DAVIES, 1996; HOUGHTON, 2002).

Apesar de haver a compensação da comunicação por outras isoformas das conexinas, indícios sugerem que existem alterações na seletividade de mensageiros que passam pelos canais. Na

ausência da Cx43, a Cx45 forma canais heterotípicos ou heteroméricos alterando a permeabilidade dessas células, e por consequência, alterando o perfil das moléculas que passam por ele (DE SOUSA, 1997).

Apesar da Cx43 ser mais abundante que a Cx45, em muitas placas juncionais ocorre a presença de ambas conexinas. Possivelmente a co-expressão delas em algumas células esteja relacionada com processos de diferenciação distintos. A figura 8 ilustra a localização das Cx43 e Cx45 no estágio de mórula do embrião.

Figura 8- Microscopia confocal mostrando a localização das Cx45 e Cx43 em embriões no estágio de mórula. (A) imunomarcção em vermelho para Cx45; (B) dupla imunomarcção para Cx45 e Cx43. Em verde a localização da Cx43 e em amarelo a co-localização das Cx45/43. Barra de escala: 25um (BLOOR, 2004).

2.4 AS CONEXINAS NO EMBRIÃO

Ao final dos primeiros dias de desenvolvimento, o embrião de camundongos se infiltra na mucosa uterina, onde dará continuação ao seu desenvolvimento. Nessa fase de blastocisto existem dois grupos de células distintas: massa celular interna e trofoblasto. As primeiras diferenciações ocorrem em tecidos primitivos, iniciando o processo de gastrulação, do qual surgem os primeiros tecidos primitivos: epiblasto e hipoblasto, também denominados ectoderma e endoderma primitivos, respectivamente (GILBERT, 1994; MOORE, 2004).

O epiblasto é um tecido primitivo derivado da massa celular interna que prolifera rapidamente, resultando no epiblasto embrionário e no extraembrionário; do primeiro irá se originar os folhetos embrionários e, por consequência, todas as células do futuro feto. O segundo formará o âmnio e seu fluido. O hipoblasto constitui a camada inferior da antiga massa celular interna, imediatamente abaixo do epiblasto, e a proliferação de suas células originará a camada interna do saco vitelínico (GILBERT, 1994; MOORE, 2004).

Durante a gastrulação, as células do trofoblasto se infiltram no endométrio uterino, diferenciando-se em células do citotrofoblasto e do sinciciotrofoblasto. Por sua vez, estas células somadas com o mesoderma extraembrionário (originado pelo epiblasto extraembrionário) formará o córion, que combinado com as células do endométrio formará o órgão chamado placenta (HOGAN, 1986; GILBERT, 1994).

Nesse processo complexo, as conexinas participam ativamente na coordenação da disseminação de sinais, possibilitando a passagem de mensageiros celulares, controlando a polaridade celular, pH, Ca^{++} intracelular e fosforilação (MELASSINÉ & CRONIER, 2005).

Buniello et al. (2004) através da técnica de hibridização *in situ* identificaram os locais de expressão de 17 isoformas das conexinas em embriões de camundongos com idade gestacional entre 9.5 e 10.5 dias. Os resultados encontrados pelo autor estão resumidos no Quadro 3.

	<i>Genes</i>																
	Cx26	Cx29	Cx30	Cx30.2	Cx30.3	Cx31	Cx31.1	Cx32	Cx36	Cx37	Cx40	Cx43	Cx45	Cx46	Cx47	Cx50	Cx59
Cérebro	+	+	+		+			+	+					+	+		
Otocisto	+		+	+	+	+	+			+	+		+	+			
Olhos												+		+		+	
Coração/vasos									+	+							
Arcos Branquiais						+	+						+				
Membros												+					
Pele	+		+		+	+	+					+	+	+	+		
Gônadas																	+
Somitos											+						

Quadro 3- Resumo dos locais de expressão de diversas conexinas em embriões de camundongos com idade gestacional entre 9.5 e 10.5. A identificação dos locais foi feita através da técnica de hibridização *in situ* (BUNIELLO, 2004)

Com 5.5 dias após coito (dpc) a Cx43 é identificada em ambos tecidos primitivos, mas não de forma abundante, predominantemente no endoderma, sendo que esse não contribuirá para a formação do feto. O aumento do número de células que expressam Cx43 ocorre no momento do surgimento das porções embrionárias e extra-embrionárias, derivados do hipoblasto, sendo nesse último o sinal mais intenso (YANCEY, 1992).

No início do 8º dpc, o processo de gastrulação já está em estágio avançado e a Cx43 é visivelmente encontrada nos três folhetos germinativos, aumentando tanto o número de células que a expressa, quanto em quantidade. A região mais rica é sem dúvida o ectoderma, que futuramente originará a placa neural. A figura 9 mostra claramente a marcação e suas regiões.

Figura 9- Embrião de camundongo com 17,5dpc em corte longitudinal. As Figuras 9A e 9B são as regiões indicadas na caixa inferior em maior aumento em microscopia confocal. (A) Região anterior. A Cx43 está distribuída no ectoderma (ec) incluindo a região da dobra cranial (hf). Eles estão interconectados com a linha do intestino primitivo (f), formada por células endodérmicas. A mesoderme (m) com exceção do coração primitivo (h) é negativo para Cx43. (B) Região Posterior. Assim como todas as regiões do embrião, o ectoderma contém numerosas ligações do tipo gap através da Cx43. Essas ligações unem as células do mesoderme, incluindo os que estão formando os somitos (s) (YANCEY, 1992).

Durante a organogênese, a expressão da Cx43 torna-se mais localizada, sendo encontrada principalmente nos órgãos primitivos e regiões específicas do cérebro em desenvolvimento e tubo neural. Para facilitar a compreensão os dados de localização foram resumidos no Quadro 4.

Órgão	Dia Gestacional				
<i>Derivados da Ectoderme</i>	9-9.5dpc	10-10.5dpc	11-11.5dpc	12-12.5dpc	13-13.5dpc
<u>Sistema Nervoso</u>					
<i>Cérebro</i>					
<i>Medula Espinhal</i>					
<i>Haste ótica</i>					
<i>Nervo Ótico</i>					
<i>Infundíbulo</i>					
<i>Epífise</i>					
<u>Órgãos do Sentido</u>					
<i>Olhos</i>					
<i>Retina</i>					
<i>Vesícula óptica</i>					
<i>Camada sensorial</i>					
<i>Epitélio pigmentado</i>					
<i>Ouvido</i>					
<i>Vesícula</i>					
<i>Otocisto</i>					
<i>Órgão olfatório</i>					
<i>Precusores dos Membros</i>					
<i>Folículo Piloso</i>					

<i>Derivados da Endoderme</i>					
<u>Sistema Digestivo</u>					
<i>Intestino Anterior</i>					
<i>Intestino Medial/Posterior</i>					
<i>Dentes</i>					
<i>Glândula Adrenal</i>					

<i>Derivados da Mesoderme</i>					
<i>Coração</i>					
<i>Átrios</i>					
<i>Ventrículos</i>					
<i>Sistema Excretor</i>					
<i>Pro / Mesonefrons</i>					
<i>Metanefrons</i>					
<i>Somitos</i>					
<i>Dermátomo</i>					
<i>Cobertura do Tecido Nervoso</i>					

Legenda.

Muito intenso Moderado Baixo Variável

Quadro 4- Expressão da Cx43 durante a organogênese, de acordo com o dia pós-coito (dpc) e a região (YANCEY, 1992).

2.5 AS CONEXINAS NO FETO

A transformação do embrião em feto é gradual. O desenvolvimento durante o período fetal envolve basicamente o rápido crescimento do corpo e a diferenciação dos tecidos, órgãos e sistemas. Durante esse período a velocidade de crescimento do corpo é muito grande, aumentando ainda mais nos dias que antecedem o nascimento (MOORE, 2004).

Em camundongos, o período médio de gestação é de 19.5 dias, podendo variar entre 18.5 até 20.5 dias conforme a linhagem (GILBERT, 1994). As linhagens que utilizamos nesse projeto, C57BL/6 (isogênica) e CD1 (não isogênica), possuem um período de gestação igual, 19.5 dias, variando em ± 12 horas.

Nesse período do desenvolvimento o padrão de expressão das conexinas já está praticamente definido, com a exceção daquelas células que ainda não estão totalmente diferenciadas e ainda passarão por processos de diferenciação (YANCEY, 1992; BUNIELLO, 2004).

É de fundamental importância o conhecimento da localização de expressão das isoformas e também da expressão simultânea de várias conexinas no mesmo tipo celular, pois esses fatores estão diretamente relacionados com diversas síndromes (WHITE & PAUL, 1999).

Através da técnica de hibridização de PROBES em cortes longitudinais de fetos com 14.5 dpc foi possível identificar os sítios de expressão através da detecção de mRNA (GENEPAINT, 2008). Um breve resumo anatômico dos fetos está ilustrado na figura 10, enquanto a localização das diversas isoformas identificadas *in situ* está ilustrada na figura 11.

Figura 10- Fotomicrografia de diferentes regiões de cortes com a identificação das estruturas anatômicas de fetos de 14.5 dpc (GENEPAINT, 2008).

Cx26
Cx30.3
Cx31
Cx32
Cx36

Figura 11- Fotomicrografia de diferentes regiões de corte com a identificação dos locais de expressão de mRNA das diversas isoformas de conexinas. A identificação é feita através da técnica de hibridização *in situ* utilizando PROBES que quando reveladas marcam os locais positivos com uma coloração marrom (GENEPAINT, 2008)

Buniello et al. (2004) analisaram a região de cabeça e pescoço de fetos neonatos de camundongos e identificou a localização de 17 isoformas das conexinas. Os resultados encontrados pelo autor estão resumidos no Quadro 5.

	<i>Genes</i>																
	Cx26	Cx29	Cx30	Cx30.2	Cx30.3	Cx31	Cx31.1	Cx32	Cx36	Cx37	Cx40	Cx43	Cx45	Cx46	Cx47	Cx50	Cx59
Cérebro	+ ^a	+ ^b	+					+ ^a	+ ^{a,b}	+		+ ^{a,c}	+	+	+		+
Cóclea	+ ^a		+	+		+				+		+	+	+			+
Olhos												+ ^{a,d}		+ ^e		+ ^{a,e}	
Folículo piloso	+ ^a				+	+						+					
Vasos sanguíneos										+ ^a	+ ^a						
Músculo											+ ^a						
Dentes												+					

a: Expressão detectada também com 14.5 dias dpc

b: Nervos

c: Meninges

d: Epitélio pigmentado da retina

e: Córnea

Quadro 5- Resumo dos locais de expressão das diferentes isoformas das conexinas em camundongos neonatos (BUNIELLO, 2004).

O gene da Cx43 é sem dúvida o mais abundante das isoformas no feto e adulto. Isso fica evidenciado na ampla marcação em diferentes órgãos em estudos realizados por diferentes autores. A noção exata dessa extensão é obtida analisando a figura 12.

Figura 12- Fotomicrografia da hibridização *in situ* para mRNA da Cx43 em fetos com 14.5 dpc. É possível compreender a extensão da expressão desse gene e a atuação dela na comunicação celular de muitos tecidos. (A) Corte longitudinal na linha medial do feto, mostrando as regiões positivas como coração e medula espinhal (setas amarelas) e regiões negativas, ossos da face (seta vermelha). (B) Corte longitudinal distanciado 1mm da linha medial, lado direito. As regiões positivas como pulmão e costelas (setas amarelas); e a região negativa o fígado (seta vermelha) (GENEPAIN, 2008).

2.6 AS CONEXINAS NO TECIDO ÓSSEO.

A osteogênese é um processo muito complexo que envolve desde a formação dos elementos básicos componentes do crânio até o esqueleto axial e apendicular (KARSENTY, 1998). Durante o desenvolvimento o formato, número e até mesmo a localização de cada elemento é coordenado e sincronizado através de programas genéticos que controlam o processo de proliferação e diferenciação dos componentes teciduais (ERLEBACHER, 1995; KARSENTY, 1999).

A maior parte do esqueleto é originada do mesoderma embrionário, incluindo os ossos do esqueleto axial, os ossos longos do apendicular e alguns ossos craniais. A maior parte dos ossos da face é composta pela migração das células da crista neural (COULY, 1993; MOORE, 2004).

O processo de ossificação possui duas origens distintas: endocondral e intramembranosa. Durante a ossificação endocondral, um molde de cartilagem hialina forma a estrutura do futuro osso, porém de tamanho menor. Essa cartilagem sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa, deposição de colágeno do tipo I, mineralização e apoptose dos mesmos. As cavidades previamente ocupadas pela cartilagem são invadidas por células osteogênicas adjacentes ao molde de cartilagem. Essas células se diferenciam em osteoblastos, depositando matriz óssea rica em cálcio. Ocorre na maioria dos ossos do esqueleto, principalmente nos ossos longos e chatos (JUNQUEIRA, 2002; MOORE, 2004)

A ossificação intramembranosa ocorre no interior das membranas do tecido conjuntivo, sendo o processo de formação dos ossos da face, como o frontal, parietal, occipital, temporal e maxilares. O processo começa no centro de ossificação primária, com a diferenciação de células mesenquimatosas que se transformam em osteoblastos. Estes sintetizam matriz osteóide (muito rica em colágeno do tipo I) que logo mineraliza, englobando alguns osteoblastos, que se diferenciarão em osteócitos (JUNQUEIRA, 2002; STAINS, 2005).

O osso é composto por regiões histologicamente distintas, possuindo regiões ricas em cartilagem como nas epífises, formando a zona de crescimento ósseo; e uma zona rica em osteócitos e matriz óssea, conhecida como diáfise, muito vascularizada, abrigando a medula óssea, composta por tecido hematopoiético. A estrutura óssea é exemplificada na figura 13 (JUNQUEIRA, 2002).

No processo de sinalização pelas regiões da superfície do osso e a disseminação desses nos citoplasmas das células, as junções do tipo gap facilitam a troca de informações entre pontos distantes do tecido, mesmo nas células envoltas na matriz ossificada. Todos os tipos celulares envolvidos no processo de desenvolvimento do osso expressam algum tipo de conexina (STAINS, 2005).

Os principais tipos celulares que participam da constituição do tecido ósseo são os condrócitos (Cx43), osteoblastos (Cx43, Cx45 e Cx46), osteócitos (Cx43) e osteoclastos (Cx43). A organização celular e a comunicação entre elas são exemplificadas na figura 14. (STAINS, 2005).

Os osteócitos ocupam as lacunas da matriz óssea, das quais partem canalículos. Dentro desses canalículos os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções comunicantes (Cx43), com outras células iguais ou com osteoblastos presentes na superfície óssea, figura 14B.

Figura 13- Fotomicrografia exemplificando as regiões morfológicas do tecido ósseo. O osso possui duas regiões distintas, as epífises e a diáfise. A epífise é rica em células cartilaginosas formando a zona de crescimento, subdividida em zona de repouso, de proliferação, hipertrófica e calcificada; e a diáfise com predomínio de osteócitos que depositam matriz óssea rica em cálcio (JUNQUEIRA, 2002).

Figura 14- Junções *gap* no osso. Os condrócitos formam uma estrutura colunar de diferenciação progressiva. Proliferativa (PRO), Pré-hipertrofica e Hipertrofica (HYP). A superfície do osso é coberta de osteoblastos (OB) e osteoclastos (OC). Na região central do osso estão localizados os osteócitos (OCY), envolvidos por matriz óssea; essas células se interconectam com outros osteócitos e com os osteoblastos da superfície através de canalículos ricos em junções *gap* (GJC), ilustrado em detalhes no retângulo vermelho (B) (STAINS, 2005).

Experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* mostraram que células com a deficiência do gene Cx43 apresentam um atraso no processo de desenvolvimento ósseo, tanto no processo endocondral, quanto no intramembranoso (LECANDA, 2000).

Osteoblastos Cx43^{-/-} cultivados *in vitro* apresentaram menor deposição de colágeno do tipo I, menor proliferação, menor atividade da fosfatase alcalina (indicador de atividade e diferenciação), sempre comparado com as células Cx43^{+/+}. As células Cx43^{+/+} apresentaram estágio intermediário nos indicadores citados (LECANDA, 2000).

Na mesma pesquisa, o autor analisou através da técnica *immunoblotting* a quantidade da proteína Cx45 nesses osteoblastos, e observou que quanto menor a quantidade de Cx43, maior a de Cx45, comprovando *in vitro* um mecanismo de adaptação das células com intuito de manter a comunicação intercelular (LECANDA, 2000).

Apesar da compensação dessa comunicação, utilizando o corante *lucifer yellow* como marcador, pois ele atravessa as células somente através das junções *gap*, percebe-se claramente que as células Cx43^{-/-} possuem grande dificuldade na transmissão do corante, e por consequência de segundo mensageiros celulares (Figura 15).

Figura 15- (A) *Immunoblotting* para Cx45, Cx43 e Tubulina de acordo com o genótipo das células cultivadas *in vitro*. Percebe-se claramente a diminuição da quantidade de proteína Cx43 de acordo com o genótipo, e inversamente proporcional a quantidade de Cx45, na tentativa de manter a comunicação intercelular. (B) Apesar do aumento da quantidade de Cx45, o corante *Lucifer yellow* que é capaz de se disseminar pelos citoplasmas somente pelas junções *gap*, não é transferido pelas células adjacentes. O contrário acontece nas células Cx43^{+/+}, a passagem ocorre de maneira normal.

Alguns genes são utilizados como marcadores de diferenciação e atividade dos osteoblastos, como a osteocalcina, a sialoproteína óssea e a fosfatase alcalina. A proteína relacionada a esses genes é encontrada em abundância no processo de ossificação e deposição de matriz óssea. Aparentemente os promotores desses genes são ativados quando há a super-expressão das Cx43 e Cx45, modulando dessa forma, a diferenciação dos osteoblastos em osteócitos e estimulando a deposição de matriz óssea (LECANDA, 1998).

2.7 O GENE Cx43.

O gene da Cx43 murino está localizado no cromossomo 10, na posição 56.097.102 – 56.110.302, possui aproximadamente 13.000 pares de bases e é constituído por duas regiões codificantes (exons), sendo que o transcrito possui 3.055 bases (GENEBANK, 2008)

O exon1 possui pouco mais de 170 bases, pertencendo à região 5'-UTR (região não traduzida); o exon2 possui aproximadamente 2.880 bases, contendo a região decodificadora da proteína. Os exons possuem alta homologia entre as espécies de mamíferos, sendo um gene com regiões muito conservadas, em especial o exon1.

Quando se acessa o GenBank, o que se verifica é que a distância que separa os éxons 1 e 2 de camundongos é muito variada em relação à medida médias das conexinas da família α (10.5Kb). Recentemente, a estrutura de gene que codifica para a Cx43 de camundongos foi redefinida identificando nove novas espécies de mRNA da Cx43 (GenBank NM010288, e AY427554 a AY427561) produzidos pela utilização de mecanismos de *splicing* alternativos (PFEITER et al., 2004).

Tal trabalho identificou três promotores alternativos e seis diferentes éxons e revelou a intrincada regulação do gene da Cx43 nos diferentes níveis: transcrição, *splicing* do pré mRNA e a tradução. Este trabalho revelou a possibilidade de alguns órgãos utilizarem promotores específicos. Essa nova visão sobre o gene levou à descoberta de mecanismos de controle pós-transcricionais, como por exemplo, a transcrição do exon1E causa o bloqueio da tradução. A nova divisão do gene Cx43 e os *splicings* alternativos estão ilustrados na figura 16.

Figura 16- Identificação das 6 novas regiões Cx43 5'-UTRs em camundongos. Diagrama mostrando organização genômica dos novos éxons da Cx43, e as combinações dos *splicing* alternativos encontrados. Adaptado de PFEITER et al. (2004). P1, P2 e P3 promotores identificados que são “utilizados” de acordo com a disponibilidade de fatores de transcrição do tecido. L = large; s = small; ATG = *start* códon. UTR: Sequência não traduzida.

2.8 CAMUNDONGOS *KNOCKOUTS* PARA Cx43.

Os animais com a deleção do gene Cx43 foram desenvolvidos por Reaume et al. (1995) através da técnica de recombinação homóloga, e inserindo do gene que promove a resistência ao antibiótico neomicina (NEO) no *loci* do exon2. A estratégia para inserção do vetor de transgênese de maneira direcionada está ilustrada na figura 17.

Figura 17- Estrutura genômica do gene Cx43 e a estratégia de inserção direcionada do vetor de transgênese. A sequência do exon2 é identificada pelo retângulo listrado. O vetor foi desenhado de maneira que o promotor do gene NEO fosse inserido após o segundo aminoácido da Cx43, deletando as regiões transmembranares da proteína. O vetor foi inserido em células ES (*Embryonic Stem*) de camundongos 129 e cultivadas *in vitro*. Os clones positivos para NEO^r foram cultivadas e depois inseridas em blastocistos provenientes da linhagem C57BL/6. Sítios de restrição: E: Exo RI; P: Pst I; Xb: Xba I; Xh: Xho I.

Observou-se que os animais com deleção do gene Cx43 nos dois alelos (Cx43^{-/-}) morriam logo após o nascimento (variando de poucos minutos até 5 horas), sem diferenças fenotípicas em relação aos normais, exceto pela aparência cianótica, evidenciando problemas na troca gasosa.

A necropsia revelou problemas na anatomia cardíaca. A região de inserção da artéria pulmonar, no ventrículo direito, apresenta um aumento significativo em seu tamanho. Os principais vasos de grande calibre não se apresentaram defeituosos (REAUME, 1995).

Alguns anos depois Ya et al. (1998) investigaram mais a fundo os problemas ocorridos no desenvolvimento cardíaco. Os autores perceberam que no 9º dia de desenvolvimento, os

animais Cx43^{-/-} apresentavam um atraso no desenvolvimento do *looping* ascendente do tubo cardíaco, acarretando a malformação do folheto antero-superior da válvula tricúspide.

Essa falha causa um refluxo do sangue venoso do ventrículo direito para o átrio direito, diminuindo o fluxo de sangue que passa pela artéria pulmonar para chegar aos pulmões, sítio de troca gasosa. Devido essa incapacidade de utilização dos gases da atmosfera é que os animais morrem logo após o nascimento com aparência cianótica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o terço final do desenvolvimento fetal de camundongos *knockouts* e heterozigotos para o gene Cx43, comparando-os com o genótipo *wild-type*, em animais de diferentes *backgrounds* C57BL/6 e CD1, em busca de possíveis alterações no desenvolvimento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros biométricos dos fetos e suas placentas ao longo do último terço gestacional, correlacionando os dados com os genótipos (Cx43^{+/+}; Cx43^{+/-} e Cx43^{-/-}) e idades (12 a 19 dias).
- Analisar histologicamente os fetos em busca das alterações causadas pela deleção do gene Cx43 ao longo do desenvolvimento fetal, e comparar os resultados obtidos entre os diferentes *backgrounds* genéticos C57BL/6 e CD1.
- Avaliar a osteogênese *in vivo* em busca de evidências histológicas e morfológicas que confirme e elucide os resultados obtidos *in vitro* por outros autores.
- Estudar, por imunofluorescência, a expressão da Cx45 durante o processo de ossificação em fetos com os genótipos (Cx43^{+/+}; Cx43^{+/-} e Cx43^{-/-}).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OS ANIMAIS

A deleção do gene da conexina 43 foi produzida por Reaume et al., (1995) através da inserção direcionada do gene NEO, um gene de seleção da expressão que promove a resistência celular ao antibiótico neomicina. Este gene foi inserido na região do exon 2 do gene Cx43, através do processo conhecido como recombinação homóloga.

Os blastocistos utilizados para injeção das células ES (*Embryonic Stem Cell*) que receberam a inserção do transgêneo eram provenientes de camundongos da linhagem C57BL/6. Assim, a deleção do gene da Cx43 foi estabilizada neste *background* genético, através de acasalamentos consecutivos por dez gerações.

Os camundongos utilizados em nossos experimentos são provenientes da International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, França e chegaram à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia através da doação do Dr. Hiroshi Yamasaki. Na França esses animais C57BL/6 foram acasalados com animais CD1, alterando o *background* genético desses animais *knockouts*, sendo nesse último, que os animais chegaram ao biotério da FMVZ-USP. Posteriormente, no Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ – USP foi alterado o *background* dos animais para a linhagem C57BL/6.

4.2 MATRIZES CD1 E C57BL/6.

O primeiro passo foi a obtenção das ninhadas de camundongos provenientes das linhagens C57BL/6 e CD1. Após o desmame, os animais foram identificados pela marcação auricular e um pequeno fragmento da cauda foi cortado para extração do DNA e identificação de seu genótipo (item 4.4). Após a genotipagem, os animais heterozigotos (Cx43^{+/-}) foram separados, de acordo com o sexo, em gaiolas de polipropileno (30x20x13), cobertas com maravalha autoclavada. As fêmeas eram mantidas em grupos de 4 animais por caixa, enquanto os machos eram mantidos sozinhos. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, permanecendo em ambiente controlado ($20 \pm 4^\circ\text{C}$ de temperatura; 45 - 75% de umidade relativa do ar; ciclos de claro e escuro de 12 horas) até completarem 60 dias de vida, idade ideal para o acasalamento.

Os casais foram formados diariamente, sempre no final do dia, por volta das 18 horas, devido o início da fase escura no ambiente do biotério. A fecundação, segundo Coop e Cockroft (1990), ocorre durante a noite. Na manhã seguinte, os animais eram separados e as fêmeas observadas para a verificação do plug na região vaginal (Figura 18). As fêmeas com prenhez confirmada eram pesadas e separadas em outra gaiola com identificação e data de confirmação da prenhez. sendo esse o dia embrionário (DE) 0.5, devido a fecundação ocorrer durante a noite.

Figura 18- Confirmação de prenhez através da identificação do plug vaginal

Utilizamos 26 fêmeas C57BL/6 e 24 fêmeas CD1 que forma divididas em grupos experimentais conforme a data de sacrifício dessas, baseando-se no DE; logo, no mínimo 3 fêmeas foram sacrificadas diariamente a partir do DE 12.5 até o parto.

4.3 OBTENÇÃO DOS FETOS.

As fêmeas prenhez foram eutanasiadas utilizando superdosagem do anestésico tiopental sódico (350mg/kg PV, i.p), seu útero contendo os fetos foram colocados em uma placa de Petri com PBS e mantidos no gelo até o momento do isolamento.

Os fetos foram separados do tecido uterino individualmente. Após essa separação, o feto apresentava-se envolto das membranas fetais e ainda preso à placenta. Depois, o amnion foi excisado para a separação de todas as membranas e o cordão umbilical também foi cortado. O feto já isolado foi pesado e medido para análise e comparação dos parâmetros biométricos, assim como a placenta após a separação das membranas fetais. Utilizou-se balança analítica para a pesagem e paquímetro digital para medição; os fetos foram medidos da nuca à cauda (do inglês *crow-to-hump*), já a placenta teve seu diâmetro medido.

As membranas fetais são constituídas de tecidos extraembrionários de mesma origem do feto, formando a membrana aminocoriônica (MOORE & PERSAUD, 2004). Por esse motivo elas foram utilizadas para extração do DNA e identificação do genótipo dos fetos. Para isso, as membranas foram separadas, lavadas 2 vezes em PBS gelado para retirada de qualquer célula materna aderida e posteriormente congeladas em freezer a -80°.

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA DAS MATRIZES E FETOS.

A identificação do genótipo dos animais adultos foi realizada através da extração de DNA de um pequeno fragmento da cauda (0,5cm) para obtenção de tecido. Como citado acima, a extração de DNA dos fetos foi realizada com os tecidos provenientes dos anexos embrionários, como saco vitelínico, córion e cordão umbilical de cada exemplar.

Os tecidos foram lisados com o acréscimo de 200uL de tampão de lise (pH 8,0) acrescido de proteinase K (Life Technologies), na proporção de 1,5mg/mL de solução. A composição do tampão de lise pode ser observada no Quadro 6.

Tampão de Lise
Tris HCl 50 mM pH 8,0
EDTA 10 mM pH 8,0
SDS 0,5%
H ₂ O MiliQ
Proteinase K 1,5 mg/mL
Quadro 6- Composição do tampão de lise

A solução foi mantida por 2 horas em banho maria à 65°C para otimizar a lise celular. Após esse período, adicionou-se 200uL do tampão de lise sem proteinase K, o qual foi mantido em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 11.000 RPM e à 4°C, durante 20 minutos. Para precipitação do DNA, cerca de 300uL do sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 400uL de etanol absoluto e 20uL de acetato de sódio 3M. As amostras foram novamente centrifugadas a 6.000 RPM à 4°C por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a lavagem e nova centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores, o pellet foi diluído com 200uL de TE pH 7,5 (Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM). A solubilização do DNA foi realizada em banho maria a 65°C, por 30 minutos, e sua quantificação 260/280nm foi realizada no aparelho *BioPhotometer Eppendorf®* utilizando diluição de 1:20 em TE.

4.5 GENOTIPAGEM

Uma alíquota do DNA extraído de cada animal adulto ou feto foi diluída para 100ng de DNA/uL de solução. A amplificação das regiões de interesse do DNA genômico através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada com os primers listados no Quadro 7.

Primers para genotipagem de animais <i>Knockout</i> para Cx43 (YAMAKAGE, 1998)
--

Cx43_f: 5'CCC CAC TCT CAC CTA TGT CTC C3'

Cx43_r: 5'ACT TTT GCC GCC TAG CTA TCC C3'

NEO_f: 5'GGC CAC AGT CGA T G AAT CCA G3'

NEO_r: 5'TAT CCA TCA TGG CTG ATG CAA3'

Quadro 7- Desenhos dos Primers para genotipagem dos animais knockouts para Cx43

Para amplificação das regiões utilizou-se o produto comercial *Taq Master Mix* (Eppendorf®), seguindo o protocolo recomendado pela empresa (Quadro 8).

Amplificação PCR

100ng DNA

8 uL Taq Master Mix Eppendorf

1 ul (10 pmol) Primer Cx43_f

1 ul (10 pmol) Primer Cx43_r

1 ul (10 pmol) Primer NEO_f

1 ul (10 pmol) Primer NEO_r

H₂O MiliQ q.s.p 20 uL

Quadro 8- Protocolo recomendado pelo *Taq Master Mix Eppendorf*®

A PCR para a Cx43 foi realizada segundo os seguintes parâmetros: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30s, 55°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos, 1 ciclo a 72°C por 4 minutos e 1 ciclo a 4°C por 60 minutos.

O gel de agarose foi preparado na concentração de 1,5%, diluído em tampão TAE (Tris HCl 40mM, ácido acético e EDTA 1mM) e submetido a eletroforese (60V) por 100 minutos para o fracionamento dos produtos da amplificação. O material genético amplificado foi corado com o corante comercial *Blue Green Loading Dye* (LGB Biotecnologia), sendo adicionado 1uL do corante para 20uL de amplificado de PCR antes da aplicação no gel de agarose. A visualização foi feita através da luz ultravioleta no transluminador.

4.6 PROCESSAMENTO PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS.

Os fetos e as placentas obtidos foram fixados em solução de formol 4% (Synth). O tempo de fixação variou conforme a idade gestacional devido ao tamanho do feto, mas principalmente devido à evolução de seu epitélio de revestimento. Assim, após vários testes, obteve-se os tempos ótimos de fixação, demonstrado no quadro 9.

Tempos de fixação	Dia Embrionário (DE)
3 dias	12.5d ; 13.5d ; 14.5d
4 dias	15.5d ; 16.5d
7 dias	17.5d ; 18.5d* ; 19.5d*

*Nessas idades foi necessário fazer pequenas excisões na pele

Quadro 9- Tempo de fixação de acordo com o DE

Após fixação, as peças foram processadas histologicamente para desidratação, diafanização e posteriormente inclusão em blocos de Paraplast Plus (Sigma, USA). Nesse processo, assim como na fixação, o DE influenciou no melhor resultado. Mas após diversos testes, conseguimos obter um único protocolo para todas as idades, facilitando o processamento. Os melhores resultados foram obtidos nos tempos listados no quadro 10.

Reagente	Tempo
Etanol 70%	2 horas
Etanol 90%	2 horas
Etanol 95%	1 hora
Etanol Absoluto I	1 hora
Etanol Absoluto II	12 horas
Etanol/Xilol (1:1)	2 horas
Xilol I	2 horas
Xilol II	2 horas
Parafina Histológica I	2 hoas
Paraplast PLUS	4 horas

Quadro 10- Tempos utilizados no processamento histológico.

Para cada ninhada foram selecionados no mínimo 2 blocos de cada genótipo, analisado nas diferentes linhagens. Os blocos de parafina foram cortados de maneira seriada com 5µm de espessura. Para cada região de obtenção de corte, foram obtidos 16 lâminas, sendo destinados 2 lâminas para cada uma das técnicas de coloração: Hematoxilina-Eosina, Picrosirius, Von Kossa-Alcian Blue; 10 lâminas silanizadas para imunofluorescência. As regiões de corte variaram conforme o estágio de desenvolvimento do feto, variando de 3 para 12.5 dias até 6 em fetos de 19.5 dias.

4.7 COLORAÇÕES

Inicialmente todas as lâminas foram analisadas pela coloração hematoxilina-eosina (HE). Esta primeira análise permitiu a busca por colorações específicas para elucidar e justificar as diferenças encontradas na análise histológica. Todas as colorações foram realizadas no laboratório de histologia do Departamento de Patologia da FMVZ.

4.7.1 Hematoxilina-Eosina

A hematoxilina se comporta como um corante básico, ligando-se com estruturas basófilas dos tecidos, como por exemplo os ácidos nucleicos, glicosaminaglicanas e glicoproteínas ácidas. Em contrapartida a eosina é um corante ácido, portanto, possui afinidade por moléculas acidófilas, como por exemplo as mitocôndrias, grânulos de secreção, proteínas citoplasmáticas e colágeno (JUNQUEIRA, 2004).

Esta é a combinação de corantes mais utilizada, resultando na coloração azul ou violeta das estruturas ácidas como os núcleos, matriz de cartilagem hialina, porções do citoplasma ricas em RNA e outras estruturas ácidas; e coloração cor-de-rosa no citoplasma e colágeno.

O protocolo de colocação da técnica de hematoxilina-eosina (HE) está descrito em detalhes no quadro 11.

Reagente	Tempo
Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Etanol Absoluto	3 minutos
Etanol 90%	3 minutos
Etanol 70%	3 minutos
H ₂ O Corrente	3 minutos
Hematoxilina	3 minutos
H ₂ O Corrente	Retirar o excesso
Etanol HCl	Rápidamente
H ₂ O Corrente	10 minutos
Eosina	1 minuto
Etanol 70%	2 trocas rápidas
Etanol Absoluto I	2 minutos
Etanol Absoluto II	2 minutos
Etanol/Xilol (1:1)	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos

Quadro 11- Protocolo para coloração Hematoxilina-Eosina

4.7.2 Picrosirius

A coloração pelo método do picrosirius faz com que grande quantidade de moléculas do corante Sirius Red, de caráter ácido, disponha-se paralelamente às moléculas do colágeno, o que provoca aumento considerável da birrefringência das fibras colagenosas quando observadas em luz polarizada. Assim, o método da coloração com picrosirius associado à microscopia de polarização é um método histoquímico específico para detecção de fibras colágenas.

O protocolo de colocação da técnica de picrosirius-hematoxilina está descrito em detalhes no quadro 12.

Reagente	Tempo
Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Etanol Absoluto	3 minutos
Etanol 90%	3 minutos
Etanol 70%	3 minutos
H ₂ O Corrente	3 minutos
Picrosirius	60 minutos
H ₂ O Corrente	Retirar o excesso
Hematoxilina	6 minutos
H ₂ O Corrente	10 minutos
Etanol 70%	2 trocas rápidas
Etanol Absoluto I	2 minutos
Etanol Absoluto II	2 minutos
Etanol/Xilol (1:1)	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos

Quadro 12- Protocolo para coloração Picrosirius-Hematoxilina.

4.7.3 Von Kossa-Alcian Blue

A técnica de Von Kossa tem como finalidade a identificação de depósitos de cálcio e fosfatos no tecido histológico. Baseia-se no tratamento do tecido com nitrato de prata, na presença de luz forte. A luz forte causa a redução dos íons de cálcio e a impregnação da prata em seu lugar, tornando os sítios calcificados visíveis (SHEHAN, 1980).

O Alcian Blue é um corante catiônico com afinidade por mucopolisacarídeos e glicosaminoglicanas, muito utilizado para identificação de cartilagem hialina, corando essas regiões em azul ou verde escuro (JUNQUEIRA, 2004).

Com a combinação destas duas técnicas de coloração, é possível delimitar no tecido ósseo fetal as regiões com depósito de matrix extracelular rica em cálcio e as regiões ainda não calcificadas, rica em cartilagem hialina. Como resultado do processo descrito teremos: em preto as regiões com depósitos de cálcio impregnadas por prata; em azul as regiões ricas em glicosaminoglicanas, principalmente as áreas formadas por cartilagem hialina; em roxo os núcleos celulares e outras matrizes com características ácidas; em cor-de-rosa citoplasma e matrizes colagenosas.

O protocolo de colocação da técnica de Von Kossa-Alcian Blue está descrito em detalhes no quadro 13.

Reagente	Tempo
Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Etanol Absoluto	3 minutos
Etanol 90%	3 minutos
Etanol 70%	3 minutos
H ₂ O Corrente	3 minutos
Nitrato de Prata 5%	50 minutos (luz forte-100W)
H ₂ O destilada	2 lavagens
Tiosulfato de sódio 5%	1 minuto
Alcian Blue pH 2	20 minutos
H ₂ O Corrente	Retirar o excesso
Hematoxilina	30 segundos
H ₂ O Corrente	Retirar o excesso
Eosina	30 segundos
Etanol 70%	2 trocas rápidas
Etanol Absoluto I	2 minutos
Etanol Absoluto II	2 minutos
Etanol/Xilol (1:1)	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos

Quadro 13- Protocolo para coloração Von Kossa-Alcian Blue.

4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA CONEXINAS 45.

Os cortes histológicos (5µm) do tecidos fixados em formol 10% foram aderidos em lâminas silanizadas, submetidos ao procedimento de desparafinização e hidratação em série alcoólica decrescente. O desmacaramento ou recuperação antigênica dos epítomos foi realizado em tampão Tris-EDTA (pH 9.0), durante 20 minutos em forno microondas (potência máxima).

Após, as lâminas foram imersas em solução de H₂O₂ 5%, diluído em metanol, durante 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Após lavagens (3x5 minutos, PBS-Tween20 pH 7.4), as lâminas foram incubadas com TNB, durante 15 minutos para bloqueio de reações inespecíficas. Em seguida, os cortes foram lavados e incubados em câmara úmida, durante 16 horas e a 4°C, com anticorpo policlonal anti-Cx45 (Zymed Laboratories) diluídos em TNB na proporção de 1:500 .

Posteriormente, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (Dako, 1:500) durante 30 minutos, em câmara úmida. Seguiu-se a conjugação com o complexo estreptavidina-peroxidase (1:100) durante 30 minutos, sendo que o sinal foi amplificado pela tiramida (Sistema TSA - *Tyramide Signal Amplification* - PerkinElmmer).

Por fim, as lâminas foram incubadas com iodeto de propídeo (1:1000) para possibilitar a visualização nuclear. As lâminas foram montadas com Vectashield para evitar o esgotamento da fluorescência (Vector Laboratories) e vedadas com esmalte. O material foi imediatamente fotografado em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência.

4.9 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO

A metodologia adotada para avaliar a ossificação do esqueleto dos fetos durante o desenvolvimento fetal foi baseada em McLeod (1980), utilizando os corantes Alizarina Red S (CI58005) e Alcian Blue 8G (CI74240).

A Alizarina Red é um corante aniônico que através do processo físico de adsorção se fixa aos íons de Ca^{2+} depositados recentemente no processo de ossificação, enquanto o corante Alcian Blue é um corante catiônico com afinidade por mucopolissacarídeos e glicosaminoglicanas, corando tecido cartilaginoso (McLEOD, 1980).

Os fetos de 15.5, 16.5 e 17.5 dias de desenvolvimento, após isolados, foram fixados em etanol 95% por 48 horas. Após esse período, os animais foram eviscerados, a pele retirada e novamente fixados por mais 48 horas (com exceção dos animais de 15.5 dias). Após esse período, os fetos foram submetidos à acetona por 24 horas para retirada do tecido adiposo. Finalizado o processo, iniciou-se a coloração diferencial descrita no quadro 14.

Os fetos permaneceram na solução de corantes por 72 horas sob agitação e, posteriormente, foram submetidos à solução clareadora de hidróxido de potássio 2% até que os tecidos moles estivessem totalmente transparentes, ficando visível somente o esqueleto corado em azul (cartilagem) e roxo (osso). Após o total clareamento, os fetos foram conservados em solução de glicerina 50% e KOH 2% (1:1) até serem analisados em microscópio estereoscópio Olympus SZX7.

Reagente	Proporção em Volume
Alcian Blue 8G 0.3% em Etanol 70%	1 V
Alizarina Red 0.1% em Etanol 95%	1 V
Ácido acético	1 V
Etanol 70%	17 V

Quadro 14- Protocolo para preparação dos corantes para coloração diferencial de osso e cartilagem.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os fetos e as placentas foram pesados e medidos logo após o isolamento, seus dados biométricos foram tabulados e agrupados conforme a linhagem, DE e genótipo. As medidas dos grupos obtidos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando-se do pós-teste Tukey para identificação de possíveis diferenças entre os genótipos.

5 RESULTADOS

5.1 OS ANIMAIS

Ao longo de 12 meses diversas ninhadas de camundongos CD1 e C57BL/6 foram genotipadas por PCR e os animais Cx43^{+/-} (heterozigotos – HT) foram separados para os acasalamentos. O padrão de bandas obtidos como resultado da genotipagem esta ilustrado na figura 19.

Figura 19- Fotografia do gel de agarose revelado em luz ultra-violeta (UV) ilustrando os padrões de banda para cada genótipo.

Resultados

Os resultados a seguir foram obtidos através da utilização de 26 fêmeas C57BL/6 e 24 fêmeas CD1, resultando em 144 e 254 fetos respectivamente de cada linhagem.

Figura 20- Gráfico representativo das proporções genóticas dos fetos utilizados no estudo. WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-} e KO: Cx43^{-/-}.

Os resultados obtidos na figura 20 indicam que os genótipos dos fetos obtidos após o acasalamento dos pais heterozigotos estão de acordo com a lei de segregação (Primeira Lei de Mendel). Assim, as proporções encontradas em nosso experimento estão de acordo com o esperado 1:2:1 (WT:HT:KO).

Esses resultados indicam que: (1) Os gametas masculinos e femininos são formados de maneira normal, tantos os carreadores do gene Cx43 quanto o do gene NEO, obedecendo a proporção de 50% para cada um deles; (2) Não há morte prematura dos animais *knockouts*, confirmando que esses animais morrem somente após o seu nascimento.

5.2 EVOLUÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FETAL

No momento da eutanásia das fêmeas, os fetos e suas placentas obtidos tiveram seus pesos e comprimentos mensurados e esses dados foram organizados conforme sua idade gestacional (12,5 a 19,5 dias) e genótipo (WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-} e KO: Cx43^{-/-}).

As médias e os desvios padrões dos resultados foram analisados e organizados em gráficos (figuras 21 e 22).

Os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias não apresentaram diferenças significativas quanto ao genótipo dos fetos e em nenhum dos outros parâmetros analisados ($p < 0,05$). Os pontos da curva de crescimento dos animais WT são estatisticamente idênticos aos dos animais HT e KO, o mesmo acontece na avaliação do peso do feto e no diâmetro e peso da placenta.

Com esses resultados percebemos que a ausência da comunicação através da Cx43 não prejudica o crescimento e ganho de peso dos animais de ambas as linhagens.

Gráficos dos dados biométricos de fetos C57

Figura 21- Curvas de crescimento e evolução do peso de fetos C57BL/6 e suas placentas, de acordo com o dia embrionário (DE) e os genótipos. WT: C_x43^{+/+}; HT: C_x43^{+/-}; KO: C_x43^{-/-}.

Gráficos dos dados biométricos de fetos CD1

Figura 22- Curvas de crescimento e evolução do peso de fetos C57BL/6 e suas placentas, de acordo com o dia embrionário (DE) e os genótipos. WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: Cx43^{-/-}.

5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS FETOS

O início do projeto partiu do objetivo de encontrar diferenças histológicas e/ou morfológicas causadas pela deleção parcial ou total do gene Cx43 em fetos de camundongos. Dessa maneira, todos os órgãos desses animais foram analisados, através de cortes seriados, na busca de qualquer alteração ocasionada pela diminuição da comunicação celular.

Como discutido, a Cx43 é amplamente distribuída e presente em diversos tipos celulares. Dessa forma, tivemos atenção especial aos órgãos em que essa proteína é presente, como pulmões, placenta, cérebro, coração, pele e ossos. Exceto pelo tecido ósseo e cardíaco, não houve alterações no desenvolvimento fetal entre os diferentes genótipos, durante o período de 12,5 até 19,5 dias.

O coração foi o primeiro órgão a ter seu desenvolvimento associado à Cx43, e posteriormente muitos outros autores investigaram características histológicas, moleculares e funcionais nesse órgão deficiente de comunicação celular, comprovando a importância desse gene no órgão. Pelo excesso de estudos realizados no coração, decidimos não nos aprofundar neste órgão. Em contrapartida, o tecido ósseo apresenta uma grande escassez de estudos realizados *in vivo*, pois os principais resultados foram descritos *in vitro*. Assim, percebemos uma lacuna na literatura e resolvermos aprofundar os nossos resultados no desenvolvimento ósseo.

5.4 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO.

A literatura relata problemas durante a ossificação de fetos *knockouts*, e *in vitro* células progenitoras do tecido ósseo apresentam sua funcionalidade diminuída. Devido esses fatos, buscamos técnicas que respondessem nossas perguntas: (1) os fetos de mesma idade (DE) e de genótipos diferentes apresentam o mesmo padrão de ossificação?; (2) o *background* genético influencia nesse processo?

A técnica de coloração diferencial, utilizando o feto completo, possibilitou uma visualização macroscópica do esqueleto. Apesar de esta técnica nos proporcionar somente indicativos do processo, pois ilustra se as regiões estão ou não com depósito de matriz óssea, ainda assim foi possível observar diferenças significativas entre os genótipos.

Por meio dessa coloração, chegamos ao consenso que a análise histológica do osso seria fundamental, e decidimos que as costelas seriam os melhores ossos a serem estudados, pois são de fácil identificação e nos proporcionaria uma ampla região de estudo.

5.4.1 Fetos de 15.5 DE

Percebemos que em fetos C57BL/6, o genótipo influencia o processo de ossificação dos animais de maneira evidente (Figura 23). Os animais WT, considerados nossos controles, apresentam a região das costelas e epífises ósseas com depósitos de cálcio (roxo) mais intenso e extenso que os animais HT e KO. Os animais HT apresentam-se em um estágio intermediário entre os WT e KO, evidenciando que esse atraso é proporcional à diminuição da comunicação celular.

O mesmo atraso é evidenciado na figura 24, em que os animais CD1 de genótipo HT e KO também apresentam diminuição de áreas calcificadas quando comparados com os WT. Relacionando o efeito do *background* é possível perceber que os animais CD1 apresentam um estágio de desenvolvimento ósseo mais adiantado que os animais C57BL/6.

Figura 23- Fotografia do esqueleto de fetos C57BL/6 com 15,5 dias de desenvolvimento. WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: Cx43^{-/-}. Coloração diferencial indicando zonas ossificadas (roxo) e cartilagem (azul). Objetiva de 1.6x.

Figura 24- Fotografia do esqueleto de fetos CD1 com 15,5 dias de desenvolvimento. WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: Cx43^{-/-}. Coloração diferencial indicando zonas ossificadas (roxo) e cartilagem (azul). Objetiva de 1.6x.

5.4.2 Fetos de 16.5 DE

Nesta idade observamos nos ossos apendiculares anteriores e posteriores o mesmo atraso no desenvolvimento visto no dia anterior, mais uma vez confirmando o efeito do genótipo na deposição de matriz óssea no esqueleto. Nas figuras 25A e B, os animais WT apresentam áreas de depósitos de cálcio (roxo) mais densas e extensas que os animais HT (Figura 25D e E) e os KO (Figura 25G e H).

Apesar de o maxilar possuir ossificação intramembranosa, é nítido o mesmo atraso dos ossos longos (ossificação endocondral). O osso do maxilar dos animais WT (Figura 25C) apresenta-se com grande deposição de cálcio, enquanto o animal HT (Figura 25F) possui áreas ainda não ossificadas e em KO (Figura 25I) não há sinais de depósitos de matriz óssea.

Figura 25- Fotografia do esqueleto de fetos C57BL/6 com 16.5 dias de desenvolvimento. WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: Cx43^{-/-}. A, D e G: Ossos do membro posterior; B, E e F: Ossos do membro anterior; C, F e I: Osso do maxilar. Coloração diferencial indicando zonas ossificadas (roxo) e cartilagem (azul). Objetiva de 1,6.

O atraso observado na linhagem C57BL/6 aparentemente não é repetido nos animais CD1 com 16.5 DE. Nos membros anteriores e posteriores não observamos diferenças na amplitude das áreas ossificadas, portanto os genótipos compartilham o mesmo estágio de desenvolvimento ósseo.

No entanto, os maxilares apresentam o atraso no desenvolvimento, o que descarta a possibilidade de erros na técnica. Todos os animais, obtidos da mesma ninhada, foram analisados e apresentaram-se semelhantes aos ilustrados na figura 26.

Figura 26- Fotografia do esqueleto de fetos CD1 com 16.5 dias de desenvolvimento. WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: Cx43^{-/-}. A, D e G: Ossos do membro posterior; B, E e F: Ossos do membro anterior; C, F e I: Osso do maxilar. Coloração diferencial indicando zonas ossificadas (roxo) e cartilagem (azul). Objetiva de 1,6.

5.4.3 Fetos de 17 DE.

Aos 17 dias de desenvolvimento dos fetos C57BL/6 de genótipos WT e HT aparentam o mesmo nível de ossificação através dessa análise macroscópica. Através da comparação da figura 27A e B (WT) com a figura 27D e E (HT), percebemos que os ossos dos membros anteriores e posteriores apresentam as mesmas regiões com depósitos de cálcio. O animal KO por sua vez, apresenta significativa diminuição da área de calcificação, percebe-se isso na comparação do fêmur e tíbia (Figura 27G) e no úmero (Figura 27H).

Os maxilares ainda apresentam diferenças entre os três genótipos, permanecendo o WT em estágio mais avançado (Figura 27C), o KO atrasado (Figura 27I) e o HT em situação intermediária (Figura 27F).

Figura 27- Fotografia do esqueleto de fetos C57BL/6 com 17.5 dias de desenvolvimento. WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: Cx43^{-/-}. A, D e G: Ossos do membro posterior; B, E e F: Ossos do membro anterior; C, F e I: Osso do maxilar. Coloração diferencial indicando zonas ossificadas (roxo) e cartilagem (azul). Objetiva de 1,6.

Aos 17.5 DE, assim como na data anterior, os fetos da linhagem CD1 aparentemente não apresentam diferenças no processo de ossificação, quando comparados entre os genótipos. Os ossos longos presentes nos membros anteriores e posteriores contêm as mesmas áreas com depósitos de cálcio, indicando estágios de calcificação similares (Figuras 28A-B e D-E).

Até mesmo as diferenças no osso da mandíbula que ocorria na idade de 16DE parecem ter diminuído. Através dessa análise macroscópica não há diferença visual na extensão da deposição de matriz óssea entre os genótipos WT e HT. O animal KO permanece atrasado em relação aos outros, porém de maneira menos intensa (Figura 28C, F e I).

Figura 28- Fotografia do esqueleto de fetos CD1 com 17.5 dias de desenvolvimento. WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: Cx43^{-/-}. A, D e G: Ossos do membro posterior; B, E e F: Ossos do membro anterior; C, F e I: Osso do maxilar. Coloração diferencial indicando zonas ossificadas (roxo) e cartilagem (azul). Objetiva de 1,6.

5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO ÓSSEO

A análise histológica dos fetos foi realizada através de cortes longitudinais seriados. Analisamos o desenvolvimento ósseo diariamente, a partir do 12º dia de desenvolvimento até o nascimento (19.5 DE), em ambas as linhagens. Como mencionado anteriormente, escolhemos os ossos da costela pela facilidade e amplitude do estudo.

Primeiramente serão apresentados os resultados obtidos com a linhagem C57BL/6 e posteriormente faremos as comparações pertinentes em relação ao efeito do *background* na osteogênese.

Com 12.5 DE, os fetos não possuem tecido ósseo definido, apresentando somente células mesenquimais iniciando agrupamentos que se tornarão futuramente as costelas. A partir de 13.5 DE os resultados começam a se tornar relevante à nossa pesquisa. Na figura 29A observamos nitidamente que os animais WT apresentam a região da costela definida, povoada em seu interior por condrócitos, alguns em mitose (Figura 29C - setas vermelhas). Nota-se visivelmente a presença de matriz cartilaginosa entre os condrócitos.

Os animais HT de mesma idade apresentam a região da costela definida, mas ao contrário dos animais WT ainda não possuem condrócitos diferenciados (Figura 29C-E). Seu interior ainda está povoado por células mesenquimais, algumas iniciando sua diferenciação em condroblastos, caracterizado pelas células arredondadas basófilas. Percebe-se discretamente a deposição de matriz cartilaginosa entre as células.

Nos animais KO percebe-se que o osso ainda não possui contornos delimitados, com muitas células mesenquimais circundando a região (Figura 29G-H). Na figura 29I, observa-se que as células que formam a massa celular são compostas por células ainda indiferenciadas, mesenquimais. Devido ao estágio indiferenciado, não há deposição de matriz cartilaginosa.

Nesse período de desenvolvimento, percebe-se claramente o atraso na histogênese do osso em animais HT e KO, quando comparados com os animais WT. Como era esperado, os animais HT encontram-se em estágio intermediário entre os WT e KO, evidenciando mais uma vez que esse atraso tem correlação com o nível de deficiência da comunicação celular.

Figura 29- Fotomicrografias do esqueleto axial, região das costelas de fetos de camundongos C57BL/6 com 13.5 dias de desenvolvimento (DE), coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. A,D e G: fotografados com objetiva de 4x; B, E e H: fotografados com objetiva de 10x; C, F e I: fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}.

Com 14.5 DE, os animais WT, nossos controles, apresentam as costelas bem definidas, possuindo no interior da estrutura condrócitos muito bem definidos (Figura 30A-B), com quase todas as células em estágio de proliferação celular; entre os condrócitos há a presença de matriz cartilaginosa. Ao redor da costela encontramos diversas camadas de osteoblastos diferenciados (Figura 26C).

Os animais HT agora possuem o molde de cartilagem hialina definido no centro da costela (Figura 30D-E), seus condrócitos encontram-se em proliferação, porém em menor quantidade que o animal WT. Ao redor notam-se osteoblastos diferenciados, presentes em poucas camadas (Figura 30F)

Os animais KO, assim como com 13.5 dias de desenvolvimento, apresentam o atraso no desenvolvimento do tecido. Nota-se que na figura 30I, que no interior já existem

condrócitos, porém poucos em proliferação. Ao redor da estrutura estão presentes células mesenquimais, algumas já diferenciadas, formando uma camada de osteoblastos, outras ainda imaturas.

Figura 30- Fotomicrografias do esqueleto axial, região das costelas de fetos de camundongos C57BL/6 com 14.5 dias de desenvolvimento (DE), coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. A,D e G: fotografados com objetiva de 4x; B, E e H: fotografados com objetiva de 10x; C, F e I: fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}.

No dia seguinte de desenvolvimento, com 15.5 dias, as costelas dos animais WT já apresentam sinais de osteoblastos infiltrando no molde de cartilagem, substituindo-o por células precursoras ósseas (Figura 31C – seta vermelha). Os osteoblastos que permaneceram ao redor já sintetizam matriz osteóide, deixando os limites da estrutura com maior densidade (Figura 31C – seta preta).

Os animais HT, ao contrário dos WT, não apresentam a infiltração dos osteoblastos, porém já sintetizam de maneira discreta matriz ao redor da estrutura. Os condrócitos presentes no molde estão iniciando o estágio de hipertrofia celular, passo esse anterior à sua morte, sendo esse fato essencial para a infiltração dos osteoblastos.

Nos animais com total deleção do gene Cx43 (KO) observamos que os condrócitos presentes no interior da costela ainda estão em proliferação celular, estágio da histogênese anterior à hipertrofia celular (Figura 31I – seta vermelha). Ao contrário dos outros genótipos, não há sinais de deposição de matriz ao redor da estrutura.

Mais uma vez nota-se claramente o atraso na osteogênese nos animais com deficiência (HT) e ausência (KO) de comunicação intercelular através dos canais formados pela Cx43.

Figura 31- Fotomicrografias do esqueleto axial, região das costelas de fetos de camundongos C57BL/6 com 15.5 dias de desenvolvimento (DE), coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. A,D e G: fotografados com objetiva de 4x; B, E e H: fotografados com objetiva de 10x; C, F e I: fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: $Cx43^{+/+}$; HT: $Cx43^{+/-}$; KO: animais $Cx43^{-/-}$.

Continuando com a nossa análise diária da osteogênese, no dia 16.5, as costelas dos animais WT já apresentam os primeiros sinais de tecido ósseo mineralizado, caracterizado pelo surgimento das trabéculas ósseas, formadas principalmente por matriz óssea, rica em fosfato de cálcio (Figura 32C – seta vermelha). Os osteócitos, responsáveis pela mineralização do tecido, estão presentes em grande número, sempre imersos na matriz (Figura 32C – seta preta).

Células do mesênquima permanecem ao redor, se diferenciando em osteoblastos. Essas células osteoprogenitoras futuramente formarão o periósteo do osso.

Nos animais HT, observa-se claramente a redução da espessura das trabéculas ósseas, bem como o menor número de osteócitos presentes no tecido, comparados ao genótipo WT. Osteoblastos continuam migrando ao interior do osso, e no processo de diferenciação, originarão osteócitos.

Resultados

Os animais KO apresentam trabéculas ósseas muito delicadas nessa idade, apresentando claramente deposição de matriz de maneira difusa. O número de osteócitos diferenciados é extremamente reduzido se comparados com o genótipo WT.

Figura 32- Fotomicrografias do esqueleto axial, região das costelas de fetos de camundongos C57BL/6 com 16.5 dias de desenvolvimento (DE), coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. A,D e G: fotografados com objetiva de 4x; B, E e H: fotografados com objetiva de 10x; C, F e I: fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}.

Ainda em fetos de 16.5 DE, observando a histogênese da tíbia notamos o mesmo padrão encontrado nas costelas (Figura 33). Levando em conta nossos animais controles (WT), percebemos as seguintes alterações nos genótipos, confirmando o atraso no desenvolvimento: Os animais HT possuem trabéculas ósseas mais delicadas na região da diáfise; menor número de osteócitos; maior zona hipertrófica da cartilagem hialina, localizada na epífise. Os animais KO de modo geral apresentam as mesmas alterações que os HT, porém de maneira mais acentuada. Suas trabéculas ósseas são ainda mais delicadas; menor número de osteócitos diferenciados; a zona de proliferação e de hipertrofia na região da epífise são maiores, indicando estágios anteriores do desenvolvimento.

Figura 33- Fotomicrografias do esqueleto apendicular, tíbia de fetos de camundongos C57BL/6 com 16.5 dias de desenvolvimento (DE), coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. A,D e G: fotografados com objetiva de 4x; B, E e H: fotografados com objetiva de 10x; C, F e I: fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}.

Aos 17.5 dias de desenvolvimento, os fetos já se encontram nos momentos finais do desenvolvimento dentro do útero. O tecido ósseo continuará seu crescimento até o final da puberdade do animal e início da vida adulta, por volta dos 90 dias de idade. Após esse período o osso não crescerá mais, somente sofrerá remodelações.

Faltando cerca de 72 horas para o nascimento, observamos que os animais WT já apresentam trabéculas ósseas muito espessas, com depósito de matriz óssea por toda a sua extensão. Muitos osteócitos imersos nessa matriz que circunda o osso. Nessa idade já é visível células hematopoiéticas no interior do osso (Figura 34C)

Nos animais HT, notamos trabéculas ósseas um pouco mais delgadas, com muitos osteoblastos ao redor da estrutura. Nesse genótipo, assim com em WT, já observamos a presença de tecido hematopoiético (Figura 34F)

Nos animais KO, analisando a figura 34I, o mesmo atraso das idades anteriores é visível, apesar de já apresentar trabéculas formadas, elas ainda não são espessas e contínuas como em WT e HT. Muitos osteoblastos permanecem indiferenciados na periferia da costela e células mesenquimais ainda estão ao redor se diferenciando em osteoblastos.

Figura 34- Fotomicrografias do esqueleto axial, região das costelas de fetos de camundongos C57BL/6 com 17.5 dias de desenvolvimento (DE), coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. A,D e G: fotografados com objetiva de 4x; B, E e H: fotografados com objetiva de 10x; C, F e I: fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: $Cx43^{+/+}$; HT: $Cx43^{+/-}$; KO: animais $Cx43^{-/-}$.

Faltando pouco mais de 24 horas para os fetos nascerem, observam-se os ossos das costelas dos animais WT desenvolvidos, com deposição de matriz óssea em abundância ao redor de toda a estrutura, com osteócitos amplamente distribuídos no osso. Notamos o aumento de células hematopoiéticas em seu interior, ocupando praticamente toda a região medular (Figura 35A-C).

Nos animais HT, percebemos trabéculas um pouco mais delicadas, porém aparentemente, a grande distância de desenvolvimento entre esse animal e o WT está menor, exceto pela quantidade de matriz depositada, as outras características histológicas estão semelhantes (Figura 35D-F).

A mesma aproximação de desenvolvimento não ocorre nos animais KO, com 18.5 dias a histogênese dos ossos das costelas permanece atrasada. Observa-se claramente a menor deposição de matriz óssea e o menor número de osteócitos presentes (Figura 35G-H).

Figura 35- Fotomicrografias do esqueleto axial, região das costelas de fetos de camundongos C57BL/6 com 18.5 dias de desenvolvimento (DE), coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. A,D e G: fotografados com objetiva de 4x; B, E e H: fotografados com objetiva de 10x; C, F e I: fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: $Cx43^{+/+}$; HT: $Cx43^{+/-}$; KO: animais $Cx43^{-/-}$.

Ao final da descrição do nosso acompanhamento diário da osteogênese, chegamos ao último dia do desenvolvimento fetal. Como dito, o osso continuará seu desenvolvimento, porém nosso estudo se ateve a investigar somente até o 19.5 DE. Nessas últimas horas dentro do útero materno, o animal está apto a viver no ambiente externo, suportando seu próprio peso e resistente a choques mecânicos que possam ocorrer. As células mesenquimais que rodeavam a estrutura das costelas, agora deram lugar a fibras musculares, e a costela já possui todas as estruturas que as farão crescer e serem capazes de se remodelarem.

Nessa idade percebemos que não há mais diferenças nítidas entre os animais WT e HT (Figura 36A-F). Aparentemente seus desenvolvimentos se igualaram, tornando os animais HT aptos à vida no ambiente, tanto quanto os animais WT.

No entanto, os animais KO permanecem deficientes de deposição de matriz, o que proporcionará ao osso fragilidade (Figura 36G-I). Observa-se de maneira clara que o atraso da

Resultados

histogênese do osso, que descrevemos desde o décimo terceiro dia de desenvolvimento, persiste até o momento do nascimento.

Figura 36- Fotomicrografias do esqueleto axial, região das costelas de fetos de camundongos C57BL/6 com 19.5 dias de desenvolvimento (DE), coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. A,D e G: fotografados com objetiva de 4x; B, E e H: fotografados com objetiva de 10x; C, F e I: fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}.

5.6 ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO.

Por meio da birrefringência das fibras coradas pela técnica *picrosirius-hematoxilina* e visualizadas sob luz polarizada, avaliamos a síntese dia-a-dia dessas moléculas nas costelas, correlacionando esses resultados com o do item 5.5 para traçar o perfil dos acontecimentos.

Observamos que aos 15.5 DE, os animais da linhagem C57BL/6 de genótipo WT (Figura 37A) já apresentam quantidades significativas de colágeno ao redor da estrutura da costela. Essa região está povoada por osteoblastos que estão iniciando a infiltração no interior da costela e se diferenciarão em osteócitos. Na mesma idade, os animais HT (Figura 37B) apresentam menor quantidade de colágeno que o WT, porém não tão reduzido quanto os animais KO, que praticamente ainda não possuem colágeno nas costelas (Figura 37C).

Aos 16.5 DE em ambas as linhagens, ocorre o aumento da deposição de colágeno, contudo, as diferenças entre os genótipos estão fortemente presentes. Nota-se claramente que os animais WT (Figura 37D) possuem maior extensão de colágeno depositada no contorno da costela, enquanto os animais KO (Figura 37F) apresentam alguns traços localizados. Novamente o genótipo HT ocupa posição intermediária (Figura 37E).

Nos dias seguintes, 17.5 e 18.5 DE, percebemos o aumento significativo da deposição de colágeno nos genótipos HT e KO, agora estando amplamente distribuído pelas costelas, porém essas quantidades estão aquém do genótipo WT, ainda indicando que os osteoblastos possuem dificuldades na síntese de colágeno (Figura 37G-I).

Observamos certa alteração aos 19.5 DE, aparentemente os genótipos WT e HT possuem a mesma quantidade de colágeno na costela (Figura 37M-N), porém KO ainda permanece com deficiência na deposição (Figura 37O), corroborando os dados da histologia que diagnosticaram o atraso na histogênese dos ossos da região da costela.

Figura 37- Fotomicrografias do esqueleto axial, região das costelas de fetos de camundongos C57BL/6. Evolução da deposição de colágeno do tipo I nas costelas ao longo da fase fetal. Fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}. Coloração específica picrosirius-hematoxilina.

5.7 ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO DE MATRIZ ÓSSEA

Nessa análise tivemos como objetivo identificar, através de colorações específicas, as regiões das costelas que apresentavam deposição de matriz óssea, com o intuito de avaliar quais seriam as consequências nesse processo em tecidos com deficiência na comunicação celular.

A coloração específica Von Kossa, através da impregnação de sais de nitrato de prata, cora as regiões ossificadas em preto, sendo assim facilmente identificáveis. Através da análise dessa coloração em cortes histológicos das costelas dos fetos C57BL/6, tivemos como resultado a figura 38.

Observamos que com 15.5 dias de desenvolvimento os fetos dos três genótipos ainda apresentam a maior parte da costela formada por células cartilaginosas, caracterizadas pela coloração azul (Alcian Blue). Os genótipos WT e HT já apresentam alguns sinais de deposição de matriz óssea ao redor da estrutura, enquanto no animal KO nada foi observado (Figura 38A-C).

Aos 16.5 DE, as alterações são impressionantes quando comparadas com o dia anterior. Não há mais sinais de cartilagem hialina e a estrutura da costela está contornada por matriz óssea. Visualmente, é possível observar que o genótipo WT (Figura 38D) possui a deposição de matriz mais intensa, caracterizada pela espessura e extensão das trabéculas. Os animais HT e KO claramente possuem menor deposição, trabéculas mais delgadas, muitas vezes restritas a alguma região da costela (Figura 38E-F).

Com 17.5 dias, as costelas dos fetos se apresentam muito bem ossificadas, porém nota-se que o animal de genótipo WT (Figura 38G) possui maior amplitude na deposição de matriz que os animais HT e KO (Figura 38H-I). Até agora esses resultados confirmam a descrição na análise histopatológica que diagnosticou um atraso na histogênese. Esse atraso na diferenciação tecidual acarretou problemas na deposição de matriz óssea.

Aos 18.5 DE, aparentemente não há diferenças na ossificação entre os animais WT e HT (Figura 38J-K). Esse resultado confrontado com a histologia indica coerência, tendo em vista que a descrição histológica havia relatado aproximação no desenvolvimento. O genótipo KO, por sua vez, apresenta grande diferença na deposição de matriz óssea, a diminuição das áreas é clara (Figura 38L).

A mesma situação ocorre no dia do nascimento, os animais KO permanecem atrasados quando comparados com os WT e HT, esses dois por sua vez não aparentam mais ter diferenças (Figura 38M-O).

Figura 38- Fotomicrografias do esqueleto axial, região das costelas de fetos de camundongos C57BL/6. Evolução da deposição de matriz óssea nas costelas ao longo da fase fetal. Fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}. Coloração específica Von Kossa.

Na figura 39, estudamos os ossos longos de fetos com 16.5 DE e observamos que os animais WT apresentam maior quantidade de matriz óssea que os animais HT e KO, suas trabéculas são mais espessas, ocupando grandes áreas na diáfise. Na região da epífise, a cartilagem hipertrófica (azul claro) possui maior massa celular que o KO, porém de maneira igual ao genótipo HT; na zona de proliferação (azul escuro), nota-se que os genótipos WT e HT possuem a mesma extensão, contudo menores que KO.

Esses resultados indicam que, assim como nas costelas, os ossos longos também possuem atrasos na ossificação e deposição de matriz óssea. O fato da zona de proliferação de células cartilaginosas ser maior em KO indica atraso, pois antecede a hipertrofia dessas células e posterior substituição por osteócitos.

Figura 39- Fotomicrografias do esqueleto apendicular, tíbia de fetos de camundongos C57BL/6 com 16.5 dias de desenvolvimento (DE), coradas pela técnica Von Kossa. A,D e G: fotografados com objetiva de 4x; B, E e H: fotografados com objetiva de 10x; C, F e I: fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}.

Quando mensuramos as áreas ossificadas e fizemos a proporção com a área das costelas comprovamos estatisticamente ($p < 0.05$) a ocorrência do atraso na deposição de matriz óssea. Na figura 40, apresentamos a evolução (em porcentagem) das áreas ossificadas nos diferentes genótipos ao longo do desenvolvimento fetal. Antes de 15.5 DE não há deposição de matriz óssea, assim, as costelas são constituídas somente de condrócitos.

Aos 15.5 DE observamos alguns traços de ossificação, como apresentado na figura 38A-C. Entre os genótipos WT e HT não há diferenças na deposição, entretanto estão mais adiantados que o KO. Aos 16.5 DE, obtivemos que os três genótipos são estatisticamente diferentes, sendo WT maior que HT, que por sua vez também é maior que KO. A partir de 17.5 DE até o nascimento os genótipos WT e HT se igualam nas áreas ossificadas, sendo ambos maiores que o KO.

Figura 40- Gráfico da evolução das áreas ossificadas em relação à área da costela (%), nos diferentes genótipos de fetos C57BL/6. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}. (*) Diferente estatisticamente em relação ao genótipo WT ($p < 0.05$).

Quando o mesmo procedimento foi realizado nos fetos CD1, observamos um padrão diferente dos apresentados pela linhagem C57BL/6. Na figura 41, os animais HT, aos 15.5 DE apresentam maior extensão nas áreas de ossificação que os animais WT e KO. Ao longo do desenvolvimento fetal, os genótipos WT e HT se igualam. Porém, ambos os genótipos sempre mantêm maiores áreas ossificadas que os animais KO.

Figura 41- Gráfico da evolução das áreas ossificadas em relação à área da costela (%), nos diferentes genótipos de fetos CD1. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}. (*) Diferente estatisticamente em relação ao genótipo WT ($p < 0.05$).

Observamos claramente o efeito do *background* no processo de ossificação, aos 15.5 DE os animais C57BL/6 apresentam baixa porcentagem de áreas ossificadas, enquanto os fetos CD1 já possuem taxas muito mais altas. Nos dias seguintes as linhagens apresentam valores próximos de porcentagem de ossificação. Nesse comparativo, percebemos que os a linhagem CD1 inicia o processo de ossificação mais precocemente que a linhagem C57BL/6.

5.8 DETECÇÃO DA CX45 NA OSTEOGÊNESE.

A Cx45, segundo relatos da literatura, está presente em osteócitos e ausente em osteoblastos, condrócitos e osteoclastos. Dessa forma, tivemos a intenção de utilizar esse gene como indicador de diferenciação dos osteoblastos em osteócitos e verificar como esse gene se comportava na ausência da Cx43. Trabalhos indicam que células deficientes em Cx43, aumentam a expressão da Cx45 com intuito de manter a comunicação intercelular.

Através da técnica de imunofluorescência, acompanhamos o processo de osteogênese desde período de 15.5 DE até o nascimento dos fetos C57BL/6. Percebemos que o anticorpo anti-Cx45 possui certa afinidade pelas proteínas que compõem a matriz óssea, dessa forma otimizamos as diluições dos anticorpos para diminuir essa marcação inespecífica.

No início do processo de ossificação, aos 15.5 DE, apesar de observarmos no estudo em H-E, a migração dos osteoblastos para o interior da estrutura e início da diferenciação em osteócitos, não obtivemos marcação, em nenhum dos genótipos (Figura 42A-C).

As primeiras marcações intensas são observadas aos 16.5 DE, mas apenas no genótipo WT (Figura 42D). Observa-se nessa figura claramente duas células no interior da costela marcadas. Nota-se também marcações em células que rodeiam a estrutura, provavelmente osteoblastos iniciando a diferenciação. Na mesma idade em animais HT (Figura 42E), observamos muitas células marcadas na periferia, porém no centro apenas duas células apresentam marcação, menos intensa que WT. O genótipo KO apresenta poucos osteoblastos periféricos positivamente marcados (Figura 42F).

É aos 17.5 DE que encontramos muitas células marcadas em WT (Figura 42G). Claramente nota-se a imensa quantidade de células no interior da costela marcadas positivamente. Já no genótipo HT (Figura 42H), também ocorre a marcação, porém em um número menor de celular e marcadas de maneira menos intensa. Os animais KO (Figura 42I) por sua vez, apresentam poucas células positivas, indicando poucos osteócitos diferenciados no interior da estrutura.

Comparativamente, o genótipo KO de 17.5 DE (Figura 42I) possui marcações muito parecidas com o WT de 16.5 DE (42D), indicando claramente o atraso da diferenciação celular dos animais *knockouts*.

Aos 18.5 dias, o genótipo WT continua amplamente marcado (Figura 42J), mas aparentemente ocorre diminuição nas células positivas para Cx45 no genótipo HT (Figura 42K). Já no genótipo KO, agora sim observamos o aumento significativo de células marcadas (Figura 42L).

Resultados

Ao nascimento, observamos a diminuição significativa de células positivamente marcadas para Cx45 no genótipo WT (Figura 42M); essa diminuição foi progressiva a partir de 17.5 DE. Nos animais KO de 19.5 DE finalmente observamos a intensa marcação de células no interior das costelas (Figura 42O), indicando a intensa atividade dos osteócitos.

Figura 42- Fotomicrografias da imunomarcção do esqueleto axial, região das costelas de fetos de camundongos C57BL/6. Evolução da marcação da proteína Cx45 nas costelas ao longo da fase fetal. Fotografados com objetivas de 20x. Genótipos: WT: Cx43^{+/+}; HT: Cx43^{+/-}; KO: animais Cx43^{-/-}. Verde: marcação positiva; vermelho: núcleos.

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento fetal de camundongos heterozigotos (HT) e *knockouts* (KO) foi avaliado e comparado sempre aos animais normais (WT). Através de cortes seriados dos fetos, acompanhamos o desenvolvimento durante o último terço da gestação (12.5-19.5 dia de desenvolvimento – DE).

Utilizamos o artifício de colorações específicas e da técnica de imunofluorescência para aprofundar nossos estudos, com o intuito de avaliar o desenvolvimento fetal em busca de qualquer alteração em que a deleção parcial ou total gene fosse a responsável.

Através das observações histológicas não identificamos anomalias na histogênese de órgãos em que a Cx43 é importante, como pulmão, placenta, cérebro e pele. Esses órgãos se apresentaram com características morfológicas e histológicas iguais entre os genótipos.

As grandes alterações foram encontradas na histogênese dos ossos. Estudos *in vitro* já haviam relatado que as células que compõem esse tecido, quando deficientes do gene Cx43 apresentam dificuldades na diferenciação e funcionalidade (LECANDA, 1998; LECANDA, 2000; STAINS, 2005).

Nossos resultados apresentados *in vivo* corroboraram com os apresentados por outros autores *in vitro*. Durante o desenvolvimento ósseo os animais KO apresentaram atraso no processo de diferenciação dos osteoblastos em osteócitos, o que levou ao atraso de maneira mais abrangente no tecido. Percebemos claramente, que aos 15.5 DE os animais *knockouts* possuem as costelas povoadas somente por condrócitos, enquanto os animais *wild-type* apresentam osteoblastos infiltrados no interior do órgão. Esse atraso persiste até o nascimento com 19.5 DE, indicando a incapacidade de o genótipo KO alcançar o desenvolvimento normal do tecido.

Os animais heterozigotos também apresentaram problemas no início do desenvolvimento, aos 15.5 DE se encontram em estágio intermediário entre os genótipos WT e KO, porém ao nascimento se igualam aos WT, nascendo em condições muito próximas ao normal.

Os problemas acarretados pelo atraso da histogênese vão muito além da falta de diferenciação celular. Percebemos atrasos na deposição de matriz osteóide, formada principalmente pelo colágeno do tipo I, e na deposição de matriz óssea. Em ambos os casos a

situação histológica confirma os resultados, indicando o atraso do genótipo KO, e situação intermediária do HT.

O fato dos animais HT se encontrarem em estágio de desenvolvimento intermediário entre os outros genótipos é explicada pela diminuição da comunicação via Cx43, porém ainda possuem canais funcionais formados por essa isoforma (STAINS, 2005). Moléculas que agem como mensageiros secundários de diferenciação celular e coordenação de funções como síntese de moléculas, tais como o colágeno, utilizam esses canais preferencialmente.

Nos animais KO, esses mensageiros se acumulam no citoplasma das células, sendo incapazes de se disseminarem pelas células vizinhas. Talvez o excesso dessas moléculas estimule a maior produção de proteínas, como de colágeno, o que explicaria o fato desses animais apresentarem a deposição de maneira localizada, nas idades de 16.5 e 17.5 DE, ao contrário dos outros genótipos.

O atraso na deposição de matriz óssea ficou claramente ilustrado no acompanhamento diário da histogênese do osso, mas comprovamos estatisticamente com um grupo grande de fetos analisados (n=6) que as fotos apresentadas refletem os acontecimentos do grupo, comprovando o atraso.

Apesar de todo o atraso da osteogênese, os fetos não diferiram quanto ao tamanho. Esperávamos que esse atraso se refletisse no tamanho dos ossos, porém isso não aconteceu. Os três genótipos apresentaram o mesmo *crow-hump* e peso, ao longo de todo o desenvolvimento que acompanhamos.

A isoforma Cx45 é relatada pela literatura como importante na diferenciação de osteoblastos em osteócitos (STAINS, 2005). Nós observamos claramente que as marcações ocorreram de maneira intensa no centro da estrutura, porém encontramos diferenças entre os genótipos. Indícios encontrados na nossa pesquisa indicam que a Cx45 só é expressa quando essas células estão em fase de diferenciação e ativadas para deposição óssea, fato esse ilustrados por fetos WT com 19.5 DE, esses animais apresentaram poucas células marcadas.

Num primeiro momento esperávamos que os animais KO apresentassem marcações mais precocemente que os outros genótipos, pois relatos da literatura dizem que essas células aumentam a expressão da Cx45 com intuito de compensar a Cx43 (LECANDA, 1998; LECANDA, 2000). Contudo observamos o contrário, quanto maior o nível de Cx43, antes a Cx45 apresentava marcação.

Esse fato deve-se à incapacidade dos canais formados pela Cx45 permitir a passagem dos mesmos sinalizadores que a Cx43, pois formam canais menores, seletivos para moléculas carregadas positivamente. Apesar do aumento da expressão, os osteoblastos continuam com

difficuldade de comunicação, postergando o surgimento dos osteócitos e por consequência células positivas para Cx45.

Ficou claro que ao final do desenvolvimento fetal os animais KO conseguiram a diferenciação dos osteoblastos em osteócitos, ocorrendo de maneira ampla a marcação. O retardo é mais uma vez confirmado através da análise da Cx45. Observa-se que aos 19.5 DE (Figura 42O), o genótipo KO apresenta o mesmo nível de marcação que o genótipo WT de 17.5 DE (Figura 42G).

Na avaliação morfológica da ossificação nos ossos formadores do esqueleto também foi possível traçar a evolução da deposição de matriz óssea nos fetos. Apesar da técnica não ser tão específica quanto à análise histológica esses resultados serviram para confirmar que o atraso ocorre de maneira generalizada nos ossos.

Um dos intuitos desse trabalho foi verificar se o *background* genético interferia no fenótipo apresentado pelos animais. Apesar dos resultados terem sido embasados na sua maioria na linhagem C57BL/6, encontramos praticamente os mesmos resultados para os animais CD1.

As únicas diferenças relevantes que encontramos foram quanto ao início do processo de ossificação. Os fetos CD1 iniciam a diferenciação dos osteoblastos e deposição de matriz, tanto osteóide, quanto óssea, antes dos animais C57BL/6. Apesar desse fato ser interessante, ele está relacionado a fatores intrínsecos à linhagem, e não a mecanismos de adaptação à ausência do gene Cx43.

Os animais CD1 possuem características não isogênicas, portanto esperávamos uma maior maleabilidade genética para se adaptar à ausência da comunicação via Cx43, porém os KO dessa linhagem apresentaram atraso em relação ao WT proporcionais aos da linhagem C57BL/6.

Na figura 41, obtivemos os resultados da evolução da deposição de matriz óssea nas costelas em fetos CD1. Aos 15.5 DE, os animais HT apresentaram regiões ossificadas maiores que os WT. Esses resultados deverão ser confirmados futuramente, e caso confirmados serão interessantes, e tentaremos elucidar os mecanismos nele envolvidos.

As análises desses animais terão continuidade com a realização dos estudos da expressão de genes envolvidos no processo de ossificação e outras isoformas das conexinas em busca de responder outras questões do processo de ossificação *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

- Os animais Cx43^{+/-} e Cx43^{-/-} apresentam alterações significativas no desenvolvimento fetal.
- A deficiência em Cx43 não afeta o crescimento e o ganho de peso dos fetos, nem das placentas, durante o último terço gestacional. Os dados biométricos obtidos durante esse período não apresentaram significância estatística, quando comparamos os diferentes genótipos.
- Além da relatada malformação cardíaca, também observamos alterações morfológicas e histológicas em ossos durante o último terço gestacional.
- A deficiência do gene Cx43 acarreta dificuldades na histogênese dos ossos. Os animais KO possuem atrasos que não são solucionados até o momento do nascimento. Os animais HT possuem situação intermediária nesse atraso, porém alcançam o desenvolvimento normal ao final da vida fetal.
- A deficiência do gene Cx43 acarreta dificuldades na deposição de colágeno e matriz óssea. Os animais KO possuem atrasos mais intensos que os HT, que não são solucionados até o momento do nascimento. Os animais HT possuem situação intermediária nesse atraso, porém normalizam o processo a partir do 18.5 DE.
- A presença da isoforma da Cx45 é observada quando os osteócitos estão diferenciados e ativados, participando do processo de ossificação. Os animais WT apresentam marcações positivas antes que os HT, por volta do 16.5 DE, enquanto os animais KO são os mais tardios, apresentando ampla marcação somente no momento do nascimento.
- O *background* genético não influencia na osteogênese, os animais de ambas as linhagens estudadas apresentaram atrasos no desenvolvimento desse tecido.

REFERÊNCIAS

- ACKERT, C.L.; GITTENS, J.E.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J.; KIDDER, G.M., Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Dev. Biol.** v.233, p.258–270, 2001.
- ALBERTS, B. **Fundamentos da Biologia Celular**. ArtMed, 1994.
- BATIAS, C.; DEFAMIE, N.; LABLACK, A.; THEPOT, D.; FENICHEL, P.; SEGRETAINE, D.; POINTIS, G., Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis, **Cell Tissue Res.** v.298, p.113– 121, 1999.
- BENNET, M.V.L.; BARRIO, L.C.; BARGIELLO, T.A.; SPRAY, D.C.; HERTZBERG, E.; SAEZ, J.C. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. **Neuron.**, v.6, p.305-320, 1991.
- BERTHOUD, V.M.; MONTEGNA, E.A.; ATAL, N.; AITHAL, N.H. BRINK, P.R.; BEYER, E.C. Heteromeric connexons formed by lens connexin, Cx43 and Cx56. **Eur. J. Cell. Biol.**, v.80, p.11-19, 2000.
- BEVANS, C.G.; KORDEL, M.; RHEE, S.K.; HARRIS, A.L. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. **Journal of Biological Chemistry.** v. 273, p. 2808–2816, 1998.
- BEVANS, C.G.; KORDEL, M.; RHEE, S.K.; HARRIS, A.L., Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.2808–2816, 1998.
- BEYER, E.C.; PAUL, D.L.; GOODENOUGH, D.A. Connexin43: a protein from rat heart homologous to gap junction protein from liver. **J. Cell. Biol.**, v.195, o.2621-2629, 1987.
- BLOOR, D.J.; WILSON, Y.; KIBSCHULL, M.; TRAUB, O.; LEESE, H.J.; WINTERHAGER, E.; KIMBER, S.J. Expression of connexins in human preimplantation embryos in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p.25, 2004.
- BUNIELLO, A.; MONTANARO, D.; VOLINIA, A.S.; GASPARINI, P.; MARIGO, V. An expression atlas of connexin genes in the mouse. **Genomics**, v.83, p. 812–820, 2004.
- COULY, G.F.; COLTEY, P.M.; LE DOUARIN, N.M. The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. **Development.** v.117, p.409–429, 1993.
- DAGLI, M.L.Z.; YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V., OMORI, Y., Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin32 only in the liver. **Carcinogenesis**, v. 25 p. 483-492. 2004.

DAMSKY, C.; SUTHERLAND, A.; FISHER, S. Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation. **FASEB J.** v. 14, p.1320-9, 1993.

DAVIES TC, BARR KJ, JONES DH, ZHU D, KIDDER GM. Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. **Dev. Genet.** v.18, p.234-243, 1996.

DE SOUSA, P.A.; VALDIMARSSON, G.; NICHOLSON, B.J.; KIDDER, G.M. Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos **Development**, v.117, p.1355-1367, 1993.

DECROUY, X.; GASC, J.M.; POINTIS, G.; SEGRETAIN, D.; Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis, **J. Cell. Physiol.**, v.200, p.146-154, 2004.

DIEZ, J.A.; AHMAD, S.; EVANS, W.H. Assembly of heteromeric connexos in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions. **Eur. J. Biochem.**, v.262, p.142-148, 1990.

ERLEBACHER, A.; FILVAROFF, E.H.; GITELMAN, S.E; DERYNCK, R. Toward a molecular understanding of skeletal development. **Cell.** v.80, p.371-378, 1995.

FRENDON JL, CRONIER L, BERTIN G, GUIBOURDENCHE J, VIDAUD M, EVAIN-BRION D, MALASSINE' A.. Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. **J Cell Sci.** v.116 p.3413-3421, 2003.

GENEPAINT. **Base de dados.** Disponível em: <<http://www.genepaint.org>> Acesso em: 20 de novembro de 2008.

GILBERT, S.E. **Developmental Biology**, ed Sinauer, 4a ed. 1994.

GONG, X.; LI, E.; KLIER, G.; HUANG, Q.; WU, Y.; LEI, H.; KUMAR, N.M.; HORWITZ, J.; GILULA, N.B., Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice, **Cell**, v.91, p.833- 843, 1997.

GROS, D. B., PAUL, D. L., AND LAMERS, W. H. Developmental changes of connexin40 and connexin43 mRNA-distribution patterns in the rat heart. **Cardiovasc. Res.** v.32, p.886-900, 1996.

HE, D.S.; JING, J.X.; TAFFET, S.M.; BURT, J.M. Formation of heteromeric gap junctional channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.96, p.6495-6500, 1999.

HENNEMANN, H.; DAHL, E.; WHITE, J.B.; SCHWARZ, H.J.; LALLEY, P.A.; CHANG, D.; NICHOLSON, B.J.; WILLECKE, K. Two gap junction genes connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expresses in skin. **J. Biol. Chem.**, v.58, p.81-89, 1992.

HOGAN, B. **Manipulating the mouse embryo.** Ed. CSH, 1986.

HOUGHTON FD, BARR KJ, WALTER G, GABRIEL HD, GRUMMER R, TRAUB O, LEESE HJ, INTERHAGER E, KIDDER GM: Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development. **Biol Reprod.** v.66, p.1403-1412, 2002.

JIANG, J.X.; GOODENOUGH, D.A. Heteromeric connexons in lens gap junctional channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.1287-1291, 1996.

KARSENTY, G. Genetics of skeletogenesis. **Dev. Genet.** v.22, p.301–313, 1998.

KARSENTY, G. The genetic transformation of bone biology. **Genes Dev.** v.13, p.3037–3051, 1999.

KIDDER, G.M.; MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, v.123, p.613–620, 2002.

KIDDER, G.M.; MHAWI, A.A., Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reprod.**, v.123, p.613-620, 2002.

KOVAL, M.; GEIST, S.T.; WESTPHALE, E.M.; KEMENDY, A.E.; CIVITELLI, R.; BEYER, E.C.; STEINBERG, T.H. Transfected connexin45 alters gap junction permeability in cells expressing endogenous connexin43. **J Cell Biol.** v.130, p.987-95 1995.

KUMAR, N.M.; GILULA, N.B. Molecular biology and genetics of gap junction channels. **Semin. Cell. Biol.**, v.3, p.3-16, 1992.

LECANDA, F.; TOWLER, D.A.; ZIAMBARAS, K.; CHENG, S.L.; KOVAL, M.; STEINBERG, T.H.; CIVITELLI, R. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. **Mol Biol Cell**, v.9, p.2249–2258, 1998.

LECANDA, F.; WARLOW, P.M.; SHEIKH, S.; FURLAN, F.; STEINBERG, T. H.; CIVITELLI, R. Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. **J. Cell Biol.** v.151, p.931–944, 2000.

MAKOWSKI, L.; CASPAR, D.L.D.; PHILLIPS, W.C., GOODENOUGH, D.A. Gap junction structures. II, analysis of the X-ray diffraction data. **J. Cell Biol.**, v.74, p. 629-645, 1977.

MALASSINE, A.; CRONIER, L. Involvement of gap junctions in placental functions and development **Biochimica et Biophysica Acta** v.1719, p.117 – 124, 2005.

MARTINEZ, A.D.; HAYRAPETYAN, V.; MORENO, A.P.; BEYER, E.C. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. **Circ Res.** v. 31, p.1100-7, 2002.

MOORE, K.L. **Embriologia básica**. Ed. Elservir, 6ª Ed. 2004.

MORENO, A.P., FISHMAN, G.I., BEYER, E.C. D.C. SPRAY, Voltage Dependent Gating and Single Channel Analysis of Heterotypic Gap Junction Channels Formed of Cx45 and Cx43, Elsevier Science B.V., 1995, pp. 405–408.

NELLES, E.; BUTZLER, C.; JUNG, D.; TEMME, A.; GABRIEL, H.D.; DAHL, U.; TRAUB, O.; STUMPEL, F.; JUNGGERMANN, K.; ZIELASEK, J.; TOYKA, K.V.;

- DERMIETZEL, R.; WILLECKE, K., Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.93, p.9565–9570, 1996
- NIESSEN, H.; HARZ, H.; BEDNER, P.; KRÄMER, K.; WILLECKE, K.J. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. **Cell Sci.** v.8, p.1365-72, 2000.
- O'BRIEN, J.; BRUZZONE, R.; WHITE, T.W.; ALUBAIDI, M.R.; RIPPS, H. loning and expression of two related connexins from the perch retina define a distinct subgroup of connexin family. **J. Neurosci.**, v.18, p.7625-7637, 1998.
- ODERMATT, B.; WELLERSHAUS, K.; WALLRAFF, A.; SEIFERT, G.; DEGEN, J.; EUWENS, C.; FUSS, B.; BUSSOW, H.; SCHILLING, K.; STEINHAUSER, C.; WILLECKE, K., Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS, **J. Neurosci.** v.23, p.4549– 4559, 2003.
- PFARRER, C. D., HEEB, C., LEISER, R. Expression of Gap Junctional Connexins 26, 32 and 43 in Bovine Placentomes During Pregnancy. **Placenta.** v. 27, p.79-86, 2006.
- PFEITER, I.; ANDERSON, C.; WERNER, R.; OLTRA, E. Redefining the structure of the mouse connexin43 gene: selective promoter usage and alternative splicing mechanisms yield transcripts with different translational efficiencies. **Nucleic. Acids. Research.**, v. 32, p. 4550-4562, 2004.
- PLUM, A.; WINTERHAGER, E.; PESCH, J.; LAUTERMANN, J.; HALLAS, G.; ROSENTRETER, B.; TRAUB, O.; HERBERHOLD, C.; WILLECKE, K., Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation, **Dev. Biol.**, v.231, p.334– 347, 2001
- POINTIS, G.; FIORINI, C.; DEFAMIE, N.; SEGRETAIN, D., Gap junctional communication in the male reproductive system. **Bioch. Bioph. Acta.**, v.1719, p.102-116, 2005.
- PRATHER, R.S.; FIRST, N.L. A Review of Early Mouse Embryogenesis and its Applications to Domestic Species **J Anim Sci.** v.66, p.2626-2635 1988.
- REAUME, A.G., DESOUSA, P.A., KULKARNI, S., LANGILLE, B.L., ZHU, D., DAVIES, T.C., JUNEJA, S.C., KIDDER, G.M. AND ROSSANT, J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. **Science.** v.267, p.1831-1834, 1995.
- RISLEY, M.S.; TAN, I.P.; ROY, C.; SAEZ, J.C.; Cell, age and stage dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes, **J. Cell Sci.** v.103 (Pt. 1), p.81–96, 1992.
- SHEEHAN, D.; HRAPCHAK, B., **Theory and practice of Histotechnology**, 2nd Ed, pp 226-227, Battele Press, 1980.
- SIMOM, A.M.; CHEN, H.; JACKSON, C.; Cx37 and Cx43 localize to zona pellucid in mouse ovarian follicles. **Cell. Comum. Addes.**, v.13, p.61-77, 2006.

SIMON, A.M.; GOODENOUGH, D.A.; LI, E.; PAUL, D.L.; Female infertility in mice lacking connexin 37, **Nature**, v.385, p.525– 529, 1997.

SRIDHARAN, S.; BREHM, R.; BERGMANN, M. COOKE, P.S., Role of connexin 43 in sertoli cells of testis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.1120, p.131-143, 2007.

STAINS, J.P.; CIVITELLI, R.; Gap junctions in skeletal development and function. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1719, p.69 – 81, 2005.

VALDIMARSSON, G.; KIDDER, G.M. Temporal control of gap junction assembly in preimplantation mouse embryos. **J. Cell Sci.** v.108, p.1715-1722, 1995.

WHITE, T.W.; GOODENOUGH, D.A.; PAUL, D.L.; Targeted ablation of connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts, **J. Cell Biol.** v.143 p.815– 825, 1998.

WHITE, T.W.; PAUL, D.L. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. **Annual Review of Physiology**, v.61, p. 283–310, 1999.

WIESEN, J.F.; MIDGLEY, A.R., Changes in expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during ovarian follicular growth. **Endocrinology**, v.133, p.741–746, 1993.

WILLECKE, K.; HENNEMANN, H.; DAHL, E.; JUNGBLUTH, S.; HEYNKES, R. The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. **Eur. J. Cell. Biol.**, v.56, p. 1-7, 1991.

WILLWCKE, K.; EIBERGER, J.; DEGEN, J.; ECKARDT, D.; ROMUALDI, A.; GULDENAGEL, M.; DEUTSCH, U.; SOHL, G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. **Biol. Chem.**, v.383, p. 725-737, 2002.

YA, J.; . ERDTSIECK-ERNSTE, E.B.H.W.; BOER, PIET, A.J. ; KEMPEN;; MARJAN, J.A.; HABO JONGSMA;; GROS, D.; MOORMAN A.F.M.; LAMERS, W.H.; Heart Defects in Connexin43-Deficient Mice, **American Heart Association**, v.82, p.360-366. 1998.

YANCEY, S.B.; BISWAL, S.; REVEL, J.P. Spatial and temporal patterns of distribution of the gap junction protein connexin43 during mouse gastrulation and organogenesis. **Development.** v.114, p.203–212, 1992.

YANCEY, S.B.; JOHN, S.A.; LAL, R.; AUSTIN, B.J.; REVEL, J.P.; The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization, topology, and functional domains. **Journal Cell Biology**, v.108-6, p.2241-2254, 1989.

YEAGER, M.; UNGER, V.M.; FALK, M.M. Synthesis assembly and structure of gap junction intercellular channels. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v.8, p.517-524, 1998.