SILVIA CATARINA SALGADO OLORIS

Avaliação do papel da conexina 43 no desenvolvimento do granuloma, experimentalmente induzido em camundongos

São Paulo 2005

SILVIA CATARINA SALGADO OLORIS

Avaliação do papel da conexina 43 no desenvolvimento do

granuloma, experimentalmente induzido em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento: Patologia

Área de Concentração: Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli

São Paulo 2005 Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Turner of the use Ministria 14/6/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

1

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1539 Oloris, Silvia Catarina Salgado FMVZ Avaliação do papel da conexina 43 no desenvolvimento do granuloma, experimentalmente induzido em camundongos / Silvia Catarina Salgado Oloris. - São Paulo : S. C. S. Oloris, 2005. 118 f. : il. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2005. Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada. Orientador: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli. 1. Junções intercelulares. 2. Granuloma. 3. Schistosoma mansoni. 4. Macrófagos. 5. Interação celular. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do papel na conexina 43 no desenvolvimento do granuloma, experimentalmente induzido em camundongos.", Protocolo nº 50/2002, sob a responsabilidade da Prof^aDr^a 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 pela referida Comissão, em sessão de 17/04/2002.

(We certify that the Research "Evaluation of the role of the connexin 43 in the development of the granuloma, induced experimentally in mice" protocol number 50/2002, under the responsability of Prof^aDr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 04/17/2002 meeting.

São Paulo, 17 de abril de 2002

Prof^a Dr^a Iúlia Presidente da ¢omissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLORIS, Silvia Catarina Salgado

Título: Avaliação do papel da conexina 43 no desenvolvimento do granuloma, experimentalmente induzido em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/__/

Banca Examinadora

Prof. Dr.	Instituição:	
Assinatura:	Julgamento:	
Prof. Dr	Instituição:	
Assinatura:	Julgamento:	
Prof. Dr.	Instituição:	
Assinatura:	Julgamento:	
Prof. Dr.	Instituição:	
Assinatura:	Julgamento:	
Prof. Dr.	Instituição:	
Assinatura:	Julgamento:	

Dedido esta tese:

Aos meus pais João Salgado Olores e Therezinha Dias Olores por todo o carinho , apoio e dedicação, por tudo que sou.

Ao meu irmão Marcelo e minhas queridas sobrinhas,

Elisa e Helena, por iluminarem nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli, pelo apoio e dedicação irrestritos, demonstrados em todos estes anos de convívio e trabalho conjunto.

Ao Departamento de Patologia Experimental, onde este trabalho foi realizado.

Prof. Dr. Marc Mesnil e Mônica de las Vegas Mesnil por me acolherem tão bem e tornar minha estadia na França mais alegre e prazerosa.

Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini, pela colaboração neste trabalho.

Ao Instituto de Medicina Tropical, FM-USP, em especial à Cristina Conceição, por terem gentilmente cedido as cercárias de *S. mansoni*.

Aos Professores Doutores José Luiz Guerra, Fernando Salvador Moreno, João Palermo Neto, Mário Mariano e Paulo César Maiorka pela colaboração neste trabalho e em toda minha formação.

Às queridas amigas: Evelise Fonseca, Mônica Sakai e Patrícia Matsuzaki, por tornarem minha carreira mais fácil e meus dias muito mais alegres.

As amigas de toda a vida: Andréa, Ana Elisa, Rosana, Tereza e Tathi.

Aos amigos do Departamento de Patologia desta casa: Émerson Flávio Freitas Mota, Luciana Neves Torres, Maria Cristina, Priscyla Taboada Dias da Silva, Valérie Le Due da Silva.

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Experimental: Cíntia, Heidge, Ivone, José Luis, Kátia Kimura, Kátia Pinello, Lucas, Márcia, Marguite.

Aos colegas e professores de Poitiers: Corine, Grazzielo, Grégory, Isabelle, Jean Claude Hervé, Karima, Laureant, Nicolas e Sophie, pela recepção e paciência.

Roberto Cabado, Departamento de Histologia, ICB- USP, pelo auxílio na recuperação das imagens de fluorescência.

Às amigas Lílian e Janaína do Departamento de Anatomia, pelo aprendizado e apoio.

Aos amigos Amine, Elisabete, Elyass, Hamide Maria, Nayeli, Otman, Pzameck, Rosa, e tantos outros do Espace Kennedy, Poitiers, pela alegria de viver.

Aos amigos participantes do programa CAPES/COFECUB: Danielle, Fabiano, Janaina, Júlio, Luciano, Míriam, Néia, Regina, Rose, Selma, por termos compartilhado a descoberta da França juntos.

À secretaria do projeto CAPES/COFECUB pela gentileza, dedicação e competência.

Aos funcionários do Departamento de Patologia: Silvia, Shirley, Cláudia, Rosires, Idalina, Cláudio, Luciano, pela colaboração e gentileza.

Ao Instituto de Ciências Biológicas – USP, por guiar os meus primeiros passos na Universidade.

FAPESP pela bolsa e auxílio concedidos: 01/0864-8, 02/08436-8.

Projeto de cooperação Brasil/França CAPES/COFECUB BEX 0173/03-7.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desta tese, muito obrigada.

RESUMO

OLORIS, S.C.S. Avaliação do papel da conexina 43 no desenvolvimento do granuloma experimentalmente induzido em camundongos. [Evaluation of the role of connexin 43 in the development of granuloma, experimentally induced in mice]. 2005. f 118. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A doença granulomatosa inflamatória envolve interações coordenadas entre linfócitos, monócitos/macrófagos, células epitelióides, eosinófilos, neutrófilos e fibroblastos. A comunicação intercelular mediada por junções gap, constituídas por conexinas, é responsável pela homeostase tecidual. A Cx43 está presente em células linfóides, células mielóides, fibroblastos e outras. Assim, para compreendermos o possível envolvimento das conexinas no granuloma, nós analisamos o efeito da deleção heterozigótica de uma Gja1 (gene Cx43) na formação e desenvolvimento dos granulomas hepáticos, induzidos por ovos de Schistosoma mansoni. Para tanto, camundongos heterozigotos (Cx43^{+/-}) e selvagens (Cx43^{+/+}) foram infectados com cercárias de Schistosoma mansoni e avaliados nos tempos: 6, 8 e 12 semanas após a infecção. As células dos granulomas apresentaram expressão de conexina 43, notadamente após 12 semanas de infecção. As lesões dos camundongos Cx43^{+/-} apresentaram índice de proliferação reduzido e aumento na deposição de colágeno em fases tardias da doença. Apesar desses achados, não se encontrou redução no tamanho e celularidade das lesões em comparação aos camundongos selvagens. Também não obtivemos diferenças em relação ao hemograma ou população de linfócitos esplênicos CD4, CD8 e CD19. As células peritoneais dos animais de ambos genótipos apresentaram produção de NO e H₂O₂ similares. Contudo, os neutrófilos e monócitos sanguíneos dos animais Cx43^{+/-}, estimulados por PMA,

apresentaram aumento significante do *burst* oxidativo. Concluindo, nossos resultados indicam que a deleção de um alelo do gene da Cx43 modifica claramente a evolução da doença granulomatosa, mostrando um papel desta conexina no desenvolvimento do granuloma.

Palavras-chave: Junções intercelulares. Granuloma. Schistosoma mansoni. Macrófagos. Interação celular.

ABSTRACT

OLORIS, S.C.S. **Evaluation of the role of connexin 43 in the development of granuloma, experimentally induced in mice.** [Avaliação do papel da conexina 43 no desenvolvimento do granuloma experimentalmente induzido em camundongos]. 2005. f 118. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Inflammatory granulomatous disease involves coordinated interactions among lymphocytes, monocytes/macrophages, epithelioid cells, eosinophils, neutrophils and fibroblasts. Intercellular communication mediated by gap junctions constituted of connexins, is responsible for tissue homeostasis. Cx43 is present in lymphoid cells, myelogenous cells, fibroblasts and others. In order to understand the possible involvement of connexins in granuloma, we analyzed the effect of the heterologous deletion of a Gia1 (Cx43 gene) on the formation and development of hepatic granulomas induced by Schistosoma mansoni eggs. Heterozigous (Cx43^{+/-}) and wild-type (Cx43^{+/+}) mice were infected with S. mansoni cercarie and evaluated after 6, 8 and 12 weeks. Granuloma cells express Cx43, with considerable reduction in Cx43^{+/-} mice. Moreover, granuloma cells from Cx43^{+/-} mice displayed reduced proliferation and increased collagen deposition at late phases of the disease. Despite these findings, no reduction of size or cellularity of the lesions was found in comparison to wildtype mice. We didn't find differences in relation to blood count and splenic lymphocyte population CD4, CD8 and CD19. Peritoneal cells from animals of both genotypes presented similar production of NO and H₂O₂. However, blood neutrophils and monocytes from Cx43^{+/-} mice, stimulated by PMA, displayed significantly increased oxidative burst. In conclusion,

our results indicate that the deletion of one allele of the Cx43 gene clearly modifies the evolution of a granulomatous disease, supporting a role for this connexin on granuloma development.

Key-words: Intercellular junction. Granuloma. Schistosoma mansoni. Macrophages. Cell interaction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO16
2 REVISÃO DE LITERATURA19
2.1 Estrutura e composição das junções gap19
2.2 Regulação das conexinas e mutações24
2.3 Conexinas – Sistema Imunológico27
2.3.1 Conexinas – Sistema Imune Inato e Inflamação
2.4 Granuloma induzido por <i>Schistosoma mansoni</i> – modelo experimental35
3 OBJETIVOS
3.1 Objetivo Geral
3.2 Objetivos Específicos
4 MATERIAL E MÉTODOS41
4.1 Animais
4.2 Certificado de Biossegurança para trabalhos com animais geneticamente
modificados
4.3 Genotipagem dos camundongos42
4.3.1 Extração de DNA da cauda dos camundongos43
4.3.2 Amplificação dos genes Cx43 e Neo por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)43

4.4 Modelo de esquistossomose murina aplicado aos camundongos Cx43 ^{+/+} e Cx43 ^{+/-} 44
4.4.1 Sacrifício e colheita dos tecidos
4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão
4.4.3 Inclusão em parafina e obtenção das lâminas histológicas47
4.4.3.1 Análise morfométrica dos granulomas hepáticos47
4.4.3.2 Quantificação do colágeno
4.4.3.3 Imunoistoquímica e quantificação das células do granuloma no ciclo celular, marcadas
pelo PCNA
4.4.3.4 Imunofluorescência da conexina 43 nos granulomas hepáticos induzidos por S.
mansoni
4.4.4 Western Blot
4.4.5 Detecção de RNAm de Cx43 por RT-PCR em tempo real51
4.4.5.1 Extração e quantificaçãode RNA total51
4.4.5.2 Transcrição Reversa
4.4.5.3 Amplificação e análise do cDNA por PCR em tempo real
4.4.6 Análise funcional de junções gap - incisão e transferência de fluorocromo (Cut-End)54
4.4.7 Lavado peritoneal
4.4.7.1 Quantificação e teste de viabilidade das células peritoneais
4.4.7.2 Determinação do peróxido de hidrogênio56
4.4.7.3 Determinação do óxido nítrico (NO)57
4.4.8 Coleta de sangue, leucograma e contagem diferencial
4.4.8.1 Citometria de fluxo
4.4.8.1.1 Imunofenotipagem da população de linfócitos esplênicos
4.4.8.1.2 Ensaio de burst oxidativo e fagocitose pela citometria de fluxo60
4.5 Análise estatística

5 RESULTADOS	62
5.1 Animais	
5.2 Análise histopatológica e microcopia eletrônica de transmissão	
5.3 Morfometria dos granulomas	71
5.4 Quantificação do colágeno	74
5.5 Quantificação da proliferação celular	76
5.6 Expressão das proteínas Cx43 e Cx32	79
5.7 Expressão gênica da Cx43	83
5.8 Transferência do fluorocromo <i>Lucifer Yellow</i>	84
5.9 Quantificação das células sangüíneas e população de linfócitos	86
5.10 <i>Burst</i> oxidativo de monócitos e neutrófilos	88
6 DISCUSSÃO	92
7 CONCLUSÕES	102
7.1 Conclusão geral	
Referências	

1 INTRODUÇÃO

As células, nos organismos multicelulares, encontram-se organizadas em tecidos, e necessitam estar em contato umas com as outras para originar grupos cooperativos; e estes, por sua vez, estão associados em várias combinações para formar os órgãos.

O princípio da cooperação metabólica pressupõe que células que requeiram intensa coordenação para o sucesso das suas atividades possuam uma vasta rede de comunicação celular. Assim, as células dos animais vertebrados podem comunicar-se por meio de vários mecanismos de comunicação direta e indireta.

A comunicação direta ocorre pela transferência da informação através da passagem de moléculas sinalizadoras (hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, entre outros) no espaço extracelular e que vão agir sobre células portadoras de receptores, canais ou vias metabólicas apropriadas. Como exemplo, podemos citar as formas de comunicação parácrina e endócrina. Este tipo de comunicação necessita de estruturas de membrana específicas. O primeiro exemplo é o tipo de comunicação receptor-ligante que é encontrado, entre outros, no sistema imunológico entre os linfócitos T e os receptores presentes nas células alvo.

O segundo modo de comunicação direta permite a passagem de sinais elétricos e a troca de moléculas hidrofílicas, de massa molecular não superior a 1200Da, entre citoplasmas de células adjacentes. Este modo de comunicação é proporcionado pela presença de junções do tipo *gap*, também denominadas junções de hiato, caracterizadas por canais intercelulares, formados por subunidades protéicas denominadas conexinas.

As conexinas estão presentes em todos os organismos metazoários e estão envolvidas no controle do crescimento celular (MOORBY, 2000), na condutância elétrica entre os tecidos excitáveis (ROZENTAL; CAMPOS-DE-CARVALHO; SPRAY, 2000; SAFFITZ, 2000), no desenvolvimento e diferenciação celulares (BERTHOUD; SAEZ, 1993; IHARA; MURAMATSU; SHIMONO, 2000; UMEZAWA; HATA, 1992), na ativação de leucócitos (JARA; BORIC; SAEZ, 1995; OLIVEIRA-CASTRO; BARCINSKI, 1974, OLIVEIRA-CASTRO; DOS REIS, 1981), nos processos inflamatórios (MARTIN et al., 1998), na hematopoiese e linfopoiese (CANCELAS et al, 2000; KRENÁCS; ROSENDAAL, 1995; ROSENDAAL et al., 1994; ROSENDAAL, 1995;), na atividade das glândulas endócrinas e exócrinas (HOUGHTON et al, 1999; MEDA, 1996; MEDA et al., 1993; MUNARI-SILEM; ROUSSET,1996) e no sistema nervoso central (O'DONNEL; GRACE, 1996; TSUKAHARA et al., 1999).

As interações coordenadas entre as células são eventos cruciais para a proliferação, migração, ativação, diferenciação e maturação das células inflamatórias. A importância das conexinas, sobretudo Cx43, tem sido relatada em processos envolvendo macrófagos, como na aterosclerose. Relatou-se recentemente, que o camundongo deficiente em Cx43 apresenta um menor desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, reduzido número de células inflamatórias associadas ao ateroma, e aumento da espessura da cápsula fibrosa que recobre as lesões (KWAK et al., 2003).

A importância das junções do tipo *gap* e conexinas na formação do granuloma nunca fora investigado antes. A formação das lesões granulomatosas é um dinâmico processo que permite à inflamação destruir ou isolar o ninho incitante, evitando a inflamação exuberante desnecessária e injuriosa (WEINSTOCK et al., 1999). Este processo envolve interações coordenadas entre linfócitos, monócitos/macrófagos, células epitelióides, eosinófilos, neutrófilos e fibroblastos.

Durante o desenvolvimento das lesões em torno de ovos embolizados, os granulomas

manifestam alterações, não somente das populações celulares ou do perfil de citocinas, mas também no tamanho das lesões e nível de fibrose. Os granulomas são maiores durante a fase aguda da infecção, tornando-se menores durante a fase crônica da doença (DOMINGO; WARREN, 1968).

Os camundongos deficientes em Cx43, desenvolvidos por Reaume et al. (1995), têm sido usados em várias pesquisas, e este enfoque tem contribuído no esclarecimento da importância funcional da Cx43 nos processos fisiológicos e patológicos. No presente estudo, nós determinamos a importância da conexina 43 no desenvolvimento do granuloma hepático, induzido experimentalmente por ovos de *Schistosoma mansoni* em animais heterozigotos para conexina 43. Neste trabalho, apresentamos a primeira evidência que as conexinas, e talvez a comunicação célula-célula, possam modular a doença inflamatória granulomatosa crônica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DAS JUNÇÕES GAP

As junções do tipo *gap* foram originalmente descritas em vários tecidos e descobertas por meio de microscopia eletrônica de transmissão. No local da estrutura da junção *gap* observa-se um intervalo regular de aproximadamente 2nm de espessura entre as membranas citoplasmáticas adjacentes (DEWEY; BARR, 1962; REVEL; KARNOVSKY, 1967).

Estudos de difração de raio X revelaram a estrutura hexamérica dessas estruturas que forma denominadas conexons (MAKOWSKI, 1977; UNWIN; ZAMPIGHI, 1980). Um conexon é um oligômero de seis proteínas de membrana, denominadas conexinas. Cada conexon encontra-se inserido na bicamada lipídica da membrana plasmática de cada célula. Assim, dois conexons conectados formam um canal intercelular que permite a passagem direta de íons e de pequenas moléculas, de aproximadamente 1kDa, entre as células justapostas (KUMAR; GILULA, 1996; NAUS, 1996; YAMASAKI, 1990; YAMASAKI, 1997).

Nos vertebrados, as junções do tipo *gap* são constituídas por uma estrutura dodecamérica formada por hemicanais, ou conexons, de seis unidades de conexinas em cada célula adjacente (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996).

Estudos envolvendo o cDNA das conexinas, revelaram que as mesmas são codificadas por uma família multigênica, representada por pelo menos 19 conexinas murinas e 20 conexinas humanas (WILLECKE, 2002) (Tabela 1). O cDNA que codifica as conexinas revela regiões de alta homologia, e regiões com pequena ou nenhuma homologia, de forma que se estabeleceu uma nomenclatura das conexinas representada pelos pesos moleculares (Cx 23, Cx26, Cx 30, Cx 30.2, Cx 30.3, Cx 31, Cx31.1, Cx 31.9, Cx32.6, Cx33, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50) (YAMASAKI; NAUS, 1996; WILLECKE et al., 2003).

Outros autores propõem uma nomenclatura alternativa baseada na análise filogenética e homologia entre os genes das conexinas, estabelecendo-se assim, as subclasses α , β e γ (KUMAR; GILULA, 1992) (Tabela 1).

Camundongo			Homem		
Conexina	Massa molecular (kDa)	Classe	Conexina	Massa molecular (kDa)	Classe
~	~	~	hCx25	25 892	n.d.
mCx26	26 411	β	hCx26	26 200	β
mCx29	28 981	n.d.	hCx30.2	30 313	n.d.
mCx30	30 366	β	hCx30	30 396	β
mCx30.3	30 388	β	hCx30.3	30 419	β
mCx31	30 901	β	hCx31	30 817	β
mCx31.1	31 394	β	hCx31.1	31 088	β
mCx30.2	30 219	β	hCx31.9	31 933	β
mCx32	32 003	β	hCx32	32 024	β
mCx33	32 860	α	~	~	\sim
mCx36	36 085	n.d.	hCx36	36 248	n.d.
mCx37	37 596	α	hCx37	37 413	
mCx40	40 413	α	hCx40	40 380	
mCx39	39 996	n.d.	hCx40.1	40 140	n.d.
mCx43	43 004	α	hCx43	43 008	α
mCx45	45 665	γ	hCx45	45 482	γ
mCx46	46 302	α	hCx46	47 427	α
mCx47	46 603		hCx47	46 655	
mCx50	49 597	α	hCx50	48 173	α
~	~	~	hCx58	58 842	n.d.
mCx57	57 114	α	hCx62	61 871	α

Tabela 1 - Comparativo entre as conexinas humanas e murinas já identificadas

Nd= não determinado

Fonte: (WILLEKE et al., 2002; WILLEKE et al., 2003).

Estudos topográficos detalhados realizados com as conexinas 26, 32 e 43 revelaram que estas proteínas apresentam 4 domínios transmembranares, 2 alças extracitoplasmáticas, 1 alça intracitoplasmática, 1 extremidade aminoterminal e 1 extremidade carboxiterminal. As conexinas apresentam uma pequena extremidade aminoterminal, de aproximadamente 20 aminoácidos, e mais uma extremidade carboxiterminal, altamente variável, constituída por 18 aminoácidos na Cx26, 156 aminoácidos na Cx43 e 275 aminoácidos na Cx57. A alça intracelular também apresenta variações em seu tamanho, 35 aminoácidos na Cx32, 55 aminoácidos na Cx43 e 105 aminoácidos na Cx47. Assim, a variação de peso molecular entre as diferentes conexinas deve-se, preponderantemente, à diferença de tamanho da extremidade carboxiterminal de suas estruturas, e de forma menos importante, à variação de tamanho da alça intracelular.

Como já mencionado, os canais de junções *gap* são constituídos por 12 proteínas, 6 em cada hemicanal. Como ilustrado na figura 1, os canais podem ser denominados de acordo com o padrão de constituição de conexinas. Assim, junções homotípicas são constituídas por aquelas onde os dois hemicanais idênticos; as junções heterotípicas, por sua vez, são compostas por hemicanais de composição distinta. Junções homoméricas são aquelas onde os conexons são constituídos por um único tipo de conexina, enquanto nas heteroméricas, os hemicanais são compostos por mais de uma conexina. (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996; WHITE et al., 1994).

O padrão de expressão de conexinas difere entre os diversos tecidos e órgãos, e mais de um tipo podem ser encontrados em uma mesma célula. Dessa forma, podemos ter canais intercelulares das mais variadas configurações: homotípicos, heterotípicos, homoméricos ou heteroméricos, que implicam em propriedades diferentes de permeabilidade celular (BEYER

22

et al., 2000; NICHOLSON et al., 2000). As junções podem ainda ser homólogas, onde 2 tipos celulares iguais estão conectados, ou, heterólogas, quando a comunicação ocorre entre tipos celulares diferentes.



Figura 1 - Esquema simplificado da conformação dos canais juncionais. Os canais homotípicos formados por 2 hemicanais de constituição idêntica. Canais heterotípicos são formados por hemicanais de diferentes constituições. Os conexons, ou hemicanais, podem ser homoméricos, quando são constituídos por 6 conexinas idênticas, ou, heteroméricos, constituídos por mais de 1 tipo de conexina. (Adaptado de ROZENTAL; CAMPOS-DE-CARVALHO; SPRAY, 2000)

A estrutura molecular da Cx43, a conexina mais abundante nos tecidos no sistema imune, foi revelada por cristalografia eletrônica. Esta técnica confirmou o arranjo dodecamérico do longo canal intercelular de 150Å construído a partir de 2 canais de 65Å cada e conectados por uma região de 55Å de espessura (UNGER et al., 1999).

O grande número de subtipos de conexinas leva a uma regulação fina da expressão gênica, do tamanho do poro do canal e de diferentes propriedades de permeabilidade.

2.2 REGULAÇÃO DAS CONEXINAS E MUTAÇÕES

As junções do tipo *gap* podem ser moduladas por inúmeros fatores tais como hormônios, neurotransmissores, citocinas, fatores de crescimento, integrinas, caderinas, componentes da matriz extracelular e canais iônicos.

A comunicação intercelular funcional resultante do acoplamento das células depende de múltiplos mecanismos de controle, incluindo a transcrição gênica, estabilidade da mensagem, modificações pós-transcricionais, estado de fosforilação, conjugação da proteína na membrana e meia vida e degradação.

A fosforilação das conexinas tem sido proposta como o principal controle da comunicação intercelular por junções *gap*. Ela atuaria em diferentes níveis de controle como: expressão gênica, modificações transcricionais e pós-transcricionais e conjugação das conexinas; transporte do conjunto para a membrana, abertura, fechamento e remoção do canal intercelular, e degradação das conexinas (SÁEZ et al., 1998).

A meia vida da Cx26, Cx32 e Cx43 é de aproximadamente 2 a 5 horas (FALLON; GOODENOUGH, 1981; LAIRD; PURANAM; REVEL, 1991). Assim, a comunicação intercelular depende de muitos fatores de controle sobre a dinâmica de síntese e degradação de conexinas. Da mesma forma, mudanças na taxa de transcrição e estabilidade do RNAm de conexinas podem ser afetadas pela ativação de segundos mensageiros intracelulares (SÁEZ et al., 1993).

Recentemente, demonstrou-se a complexidade da regulação do gene da Cx43 em muitos níveis, como: transcrição, *splicing* de pré RNAm e tradução. Este gene possui 3 regiões promotoras, 6 exons e 9 RNAm diferentes que codificam a conexina 43. Os promotores P1, P2 e P3 podem ser regulados diferentemente e determinam a escolha do exon a ser transcrito. Estes mecanismos parecem ser muito conservados evolutivamente e podem ser indicativo da necessidade de fina regulação da comunicação intercelular em cada tipo celular e em diferentes condições e situações. (PFEIFER et al., 2004)

Mudanças transitórias na comunicação intercelular, reguladas notadamente por fosforilação das conexinas, têm sido observadas e parecem necessárias ao ciclo celular normal. Assim, Solan et al. (2003) demonstraram que os níveis de fosforilação de um resíduo de serina S368 da Cx43 são aumentados nas fases S e G_2/M do ciclo celular, e que nas células quiescentes o nível de fosforilação é próximo de zero. Assim, a fosforilação da Cx43 está diretamente relacionada ao menor nível de comunicação intercelular, apresentado pelas células em fase S. Da mesma forma, o menor nível de fosforilação da Cx43 nas células quiescentes, ou seja, na fase G_0 do ciclo celular, implicam em um maior nível de comunicação.

Contradizendo esses achados, outros autores demonstraram que a comunicação mediada pelas junções *gap* seria de intensidade moderada na fase G₁/S, maior na fase S, e menor nas fases G₂/M (BITTMAN; LOTURCO, 1999; STEIN; BOONSTRA; BURGHARDT, 1992). A diminuição da comunicação juncional durante a fase G₂/M também está correlacionada ao aumento da fosforilação da Cx43 (KANEMITSU; JIANG; ECKHART,1998; LAMPE et al., 1998a) e redistribuição da Cx43 da membrana para o citoplasma (LAMPE et al., 1998a; XIE et al., 1997). Tomados em conjunto, estes estudos sugerem que a Cx43 pode ser importante no ciclo celular por meio da fosforilação dos aminoácidos de sua extremidade carboxiterminal.

A junção *gap* também requer a participação de outras proteínas envolvidas no transporte de conexinas, na formação da junção *gap*, e na regulação da abertura e fechamento do canal. Dentre as principais proteínas que interagem com as conexinas destacam-se: ZO-1 e ZO-2 (zônula ocludens) (SINGH; LAMPE, 2003), *v-Src* (oncoproteína viral *Src*), *c-Src*

(proteína *Src* celular), α- e β-cateninas, α- e β-tubulinas (GIEPMANS; VERLAAN; MOOLENAAR, 2001), caderinas (JONGEN et al. 1991), caveolinas, proteínas kinases (PKA, PKC, PKG, MAPK, Cdc2, CK1), ocludinas e claudinas. (GIEPMANS, 2004)

Até o presente momento, está bem caracterizada a interação entre as proteínas ZO-1, cateninas e caderinas, que se apresentam co-localizadas em relação à junção *gap* constituída pela Cx43. Estas proteínas, presentes nas junções aderentes, são fundamentais para a estabilização das junções *gap* e degradação por via endocítica (SEGRETAIN et al., 2004). Interessante notar que, assim como as conexinas, as proteínas da junção aderente são reguladas pela fosforilação de resíduos de tirosina de suas estruturas.

A ativação de Src viral ou celular também está relacionada ao fechamento do canal intercelular por meio de fosforilação dos resíduos Tyr247 e Tyr265 da porção carboxiterminal da Cx43 (LIN et al., 2001).

Alterações da comunicação intercelular através de junções do tipo *gap* podem causar várias anomalias, levando a diferentes doenças em seres humanos. Muitas mutações em genes das conexinas foram relatadas, como por exemplo, a Cx26 na surdez sensorioneural não sindrômica (KELSELL et al., 1997) e no queratoderma palmoplantar (RICHARD et al., 1998a), a Cx31 na eritroqueratodermia variabilis (RICHARD et al., 1998b) e distúrbios da audição (XIA et al., 1998), a Cx32 na doença de Charcot-Marie-Tooth ligada ao cromossomo X (BERGOFFEN et al., 1993), a Cx46 e Cx50 na forma hereditária da catarata (SHIELS et al., 1998). Acredita-se que muitas dessas mutações possam ser do tipo perda-de-função, e que algumas possam ocorrer de forma dominante-negativa (WHITE, 1998).

2.3 CONEXINAS – SISTEMA IMUNOLÓGICO

As junções comunicantes estão presentes no sistema imune de mamíferos e em invertebrados. Junções comunicantes funcionais são encontradas, por exemplo, em cultura de células epidérmicas de insetos, *Tenebrio molitor* (CHURCHILL; CAVENEY, 1993).

Como mostrado na tabela 2, a expressão das conexinas 37, 40 e 43 nos leucócitos tem sido demonstrada por meio de diversas técnicas.

Leucócitos	conexinas	espécie	condições	evidências
Neutrófilos	Cx43	Homem	LPS ou TNFa	IF, WB
		Homem	Não tratado	IF, WB
		Hamster	LPS	IF, WB
	Cx40	Homem	LPS ou TNFa	IF, WB
		Homem	Não tratado	IF, WB
	Cx37	Homem	Não tratado	IF, WB
Monócitos/	Cx43	Homem	Células escamosas de ateroma	NB
Macrófagos				
		Homem	LPS e IFNγ ou TNFα e IFNγ	WB, NB
		Camundongo	Linhagem J774	WB, NB
		Camundongo	LPS e IFNy	IF, WB, EM
		Hamster	LPS	IF, WB, EM
		Camundongo	Cultura 1ª de micróglia	WB, EM
	Cx37	Homem/	Ateroma	IF
		Camundongo		
Linfócitos	Cx43	Homem	Sangue periférico e tonsilas	WB, RT-PCR,
				FACS
		Camundongo	linfonodos	IF
	Cx40	Homem	Tonsilas	WB, RT-PCR,
				FACS
	Cx37	Homem	Sangue periférico	IF
		Camundongo	linfonodos	IF

Tabela 2 - Expressão de conexinas em leucócitos

IF, imunofluorescência; WB, *Western Blot*; NB, *Northen Blot*; RT-PCR, reação de cadeia de polimerase por transcrição reversa; FACS, citometria de fluxo; EM, microscopia electrônica; LPS, Lipopolissacarídeo; TNFα, fator de necrose tumor al-α; IFNγ, interferon-γ. Fonte: (WONG; CHRISTEN; KWAK, 2004)

Os primeiros relatos sobre a importância da comunicação intercelular no sistema imune foram publicados nos anos 70 e descreviam a presença deste tipo de comunicação direta entre linfócitos (BARCINSKI; CUKIERMAN, 1973; HULSER; PETERS, 1972; OLIVEIRA-CASTRO).

A conexina mais amplamente distribuída no sistema imune é a Cx43, e tem-se atribuído a ela papel relevante na hematopoiese e linfopoiese.

Nesse sentido, Dorshkind et al. (1993) demonstraram a presença de junções comunicantes e expressão de conexina 43 em células estromais da medula óssea mantidas em cultura. Os autores relataram ainda, não haver comunicação intercelular heteróloga entre os linfócitos em desenvolvimento e células estromais em co-cultura.

Rosendaal et al. (1994) mostraram que a expressão gênica de conexina 43 na medula óssea de camundongos adultos é rara, mas que seu nível apresentava-se 80 vezes aumentado na medula de camundongos neonatos. Assim, os autores propõem a existência de uma rede de células medulares conectadas via Cx43 de forma latente, e que esta rede seria intensamente amplificada em resposta a eventos de ativa divisão celular, como na regeneração após tratamento citotóxico, ou no estabelecimento da medula na fase neonatal.

Cancelas et al. (2000) demonstraram que células hematopoiéticas progenitoras, oriundas de animais *knockout* para Cx43 (Cx43^{-/-}), possuem menor capacidade proliferativa em cultura. Este fenômeno é revertido com a reintrodução do gene da Cx43 nessas células.

Embriões $Cx43^{-/-}$ também apresentam defeitos na linfopoiese e maturação de linfócitos. Animais neonatos $Cx43^{-/-}$ e $Cx43^{+/-}$ possuem celularidade aumentada do timo, aumento de linfócitos T CD4⁺CD8⁺, e reduzida freqüência de linfócitos T CD4⁺ em comparação aos animais selvagens (Cx43^{+/+}). No entanto, estas mesmas avaliações realizadas em animais Cx43^{+/-} adultos não indicaram a persistência dessas deficiências. Quanto à

linfopoiese de linfócitos B, animais Cx43^{-/-} e Cx43^{+/-} apresentaram maior freqüência de células pró-B (CD45R⁺, IgM⁻ superficie) no figado fetal em relação aos embriões selvagens. Também não foram detectadas diferenças entre os genótipos em relação à população de linfócitos pré ou pró B, medulares ou esplênicos. As únicas diferenças foram encontradas nas células CD45R, que persistiram nos animais adultos somente na fração de células CD43⁺ CD24(HSA)⁺. (MONTECINO-RODRIGUEZ; LEATHERS; DORSHKIND, 2000)

Corroborando com os resultados de Rosendaal et al. (1994), Montecino-Rodriguez, Leathers e Dorshkind, (2000) demonstraram que os animais Cx43^{+/-}, que possuem apenas um alelo da Cx43, tem a regeneração das células mielóides e linfóides severamente prejudicada após tratamento citotóxico com 5-Fluorouracil (5-FU).

Estes resultados indicam que a conexina 43 e as junções do tipo *gap* são importantes na hematopoiese, linfopoiese e maturação dos linfócitos. E como dito anteriormente, na medula óssea, as conexinas e as junções foram encontradas apenas entre as células estromais. De fato, as junções *gap* desempenham papel fundamental nestes processos devido à criação de um microambiente adequado à proliferação e diferenciação das células progenitoras.

Comprovando que a importância da conexina reside na comunicação intercelular entre as células estromais, demonstrou-se que células progenitoras, provenientes de figado fetal de camundongos Cx43^{+/-}, tinham sua capacidade de repovoamento de leucócitos e células vermelhas restabelecida, quando implantadas em animais selvagens Cx43^{+/+} tratados com 5-FU. O 5-FU é citotóxico apenas para células que estão em ciclo celular; dessa forma, as células estromais são preservadas. (ROSENDAAL; STONE, 2003)

A expressão da Cx43 está intimamente associada às regiões da medula óssea onde a hematopoiese é mais intensa, ou seja, no endósteo dos sinusóides e nas células estromais adventícias, tanto em camundongos como em humanos (KRENACS; ROSENDAAL, 1998). As células estromais se adaptam à demanda de formação de sangue e podem se diferenciar em

adipócitos. Umezawa e Hata (1992) relatam a menor expressão da Cx43 durante a diferenciação de células estromais humanas em adipócitos.

Assim como a expressão de conexina 43 é extensamente relatada na medula óssea, muitos trabalhos também demonstraram sua importância no timo e em órgãos linfóides secundários como baço e linfonodos.

As células T linfóides progenitoras diferenciam-se na medula óssea e, então migram para o timo; lá os timócitos permanecem em contato com as células estromais, que contribuem para sua maturação e diferenciação. As células estromais, ou reticulares epiteliais, formam um retículo de prolongamentos celulares unidos por desmossomos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Fatores solúveis produzidos no microambiente tímico e as interações celulares mediadas pelos receptores de superfície celular são importantes na maturação dos timócitos (SAVINO; DARDENE, 2000).

A expressão da Cx43 nas células epiteliais tímicas foi evidenciada por meio de diversas técnicas como imunoistoquímica, *Northern blot* e *Western blot*. Além disso, a comunicação intercelular no timo também foi demonstrada, tanto em humanos como em modelos murinos, por meio de microinjeção do fluorocromo *Lucifer Yellow* e experimentos de eletrofisiologia, como duplo *patch-clamp* (ALVES et al., 1995; HEAD et al., 1997). Recentemente, confirmou-se a expressão de Cx43 e Cx30.3 também nos timócitos, embora não tenha sido encontrada comunicação intercelular funcional (FONSECA et al., 2004).

A existência de junções comunicantes no epitélio tímico indica que este tecido pode estar conectado, formando uma rede e determinando um único microambiente tímico. Uma outra hipótese é que a comunicação intercelular seja restrita a pequenas áreas, originando distintos microambientes independentes. Esta última hipótese também poderia ser aplicada à medula óssea, onde as interações mediadas pelas junções *gap* originariam microambientes diferentes que determinariam a diferenciação de linfócitos T e B (ALVES; CAMPOS-DE-CARVALHO; SAVINO, 1998).

Os linfócitos maduros deixam o timo e povoam os órgãos linfóides secundários onde continuam a se diferenciar frente ao estímulo antigênico. Este processo é marcantemente dependente do contato direto célula-célula e cooperação.

Nesse sentido, as junções comunicantes funcionais também têm sido relatadas nos órgãos linfóides periféricos. A junção *gap* formada por conexina 43 é importante na comunicação intercelular nos centros germinativos de linfonodos e tonsilas, onde as células dendríticas estão conectadas umas às outras e também com linfócitos B (KRENACS; ROSENDAAL, 1995; KRENACS et al., 1997). O aumento da expressão da proteína e RNAm da conexina 43, nos centros germinativos, está possivelmente relacionada à apresentação e processamento de antígenos (KRENACS et al., 1997), eventos estes que resultam em expansão clonal de linfócitos.

A conexina 43 também é expressa e localizada na membrana plasmática de linfócitos periféricos T, B e NK (OVIEDO-HORTA; HOY; EVANS, 2000). Tendo em vista que estas células são circulantes, estas observações são altamente sugestivas da presença de hemicanais em linfócitos, com a função alternativa de comunicação via propagação de cálcio (BRAET et al., 2003).

A conexina 43 pode interferir na ativação de linfócitos, independentemente da formação do canal juncional ou hemicanal. Assim, demonstrou-se que peptídeos que mimetizam a alça extracelular da Cx43 têm capacidade de reduzir marcantemente a produção de imunoglobulinas G, M e A de linfócitos T e B em cultura, e ainda possuem efeitos inibitórios sobre a produção de citocinas, especialmente IL-10 e menos intensamente IL-2 (OVIEDO-HORTA; GASQUE; EVANS, 2001).

2.3.1 Conexinas – Sistema Imune Inato e Inflamação

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo contra a infecção por patógenos, e consiste basicamente de células fagocíticas - neutrófilos e macrófagos, células dendríticas e células matadoras naturais (*natural killer*, NK) que atuam de forma integrada na eliminação dos agentes infecciosos.

As primeiras evidências da ocorrência de junções *gap* em células migratórias do sistema imune foram obtidas a partir da detecção de acoplamento elétrico em macrófagos murinos em cultura e orientados linearmente (LEVY et al., 1976).

Os trabalhos que sucederam os da década de 70 continuaram relatando a presença das conexinas em monócitos/macrófagos, estimulados ou não. Beyer e Steinberg (1991) descreveram a presença de poros na membrana plasmática de macrófagos murinos, formados por Cx43, em resposta ao aumento de ATP extracitoplasmático. Estes hemicanais, que permitem a direta comunicação entre os meios citoplasmático e extracelular, podem ser potencialmente nocivos, pois se as células não formarem rapidamente o canal intercelular completo com uma célula adjacente, podem morrer devido ao estresse metabólico. Contreras et al. (2003) também relataram a presença de hemicanais em células HeLa transfectadas com Cx43, e propõem que este seja potencialmente um mecanismo de sinalização normal.

Alves et al. (1996) não encontraram evidências de junções comunicantes entre macrófagos, ou hemicanais *in vitro*. No entanto, devido à expressão de conexina 43 nos macrófagos, os autores não descartam a possibilidade da ocorrência transitória de junções funcionais homólogas ou heterólogas *in vivo* entre os macrófagos ou entre macrófagos e células endoteliais.

De fato, a expressão de conexina 43 já foi demonstrada entre os leucócitos e células endoteliais na reperfusão após isquemia, e também *in vitro*, após a ativação de leucócitos peritoneais por LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) (JARA; BORIC; SAEZ, 1995).

Navab et al. (1991), estudando as possíveis interações entre os monócitos e as células da parede aórtica humana, relataram aumento de RNAm de Cx43 nos monócitos mantidos em co-cultura com as células endoteliais.

Recentemente, Eugenín et al. (2003) demonstraram haver expressão de conexina 43 e formação de junções *gap* entre monócitos/macrófagos humanos estimulados *in vitro* por TNF- α e IFN- γ . Os autores sugerem ainda, que o aumento da expressão de conexina 43 de monócitos/macrófagos tratados por TNF- α e IFN- γ estaria relacionado a maior capacidade de transmigração por entre células endoteliais em um modelo *in vitro*.

A comunicação intercelular via junções *gap* também é importante no processo de aterogênese. Polacek et al. (1997) demonstraram que macrófagos (*foam cells*) provenientes de placas de ateroma humanos apresentam uma maior expressão de RNAm de Cx43. Não somente a conexina 43, mas também a conexina 37, são diferencialmente expressas na evolução da aterosclerose (KWAK et al., 2002). Além disso, animais deficientes em conexina 43 (Cx43^{+/-}) têm o desenvolvimento de ateromas experimentais marcantemente diminuído devido, possivelmente, à menor infiltração de leucócitos na lesão (KWAK et al., 2003). Sabese que no ateroma avançado, as células endoteliais apresentam maior expressão de Cx43 em zonas de fluxo sanguíneo turbulento, localização esta preferencial para a adesão e migração de leucóctios.

As conexinas estão envolvidas no processo cicatricial da pele e também são diferencialmente expressas. A resolução do processo está associada à menor expressão da Cx43 e menor migração de leucócitos para a lesão (BRANDNER et al., 2004). Do mesmo

modo, a terapia *anti-sense* que bloqueia localmente a expressão da Cx43, acelera a taxa de cicatrização de lesões incisionais ou excisionais (QIU et al., 2003).

A menor expressão de Cx43 nos leucócitos ou células endoteliais pode prejudicar parcialmente o processo de transmigração de leucócitos ao local da lesão. A menor capacidade de angiogênese apresentada pelos camundongos Cx43^{+/-}, recentemente descrita em modelo experimental de neovascularização da córnea, também pode ser relevante na capacidade de migração de leucócitos (Sá Rodriguez, 2005).

Martin et al. (1998) também descreveram a ocorrência de comunicação intercelular heteróloga, mediada por junções *gap*, entre linhagens murinas de macrófagos e células epiteliais do intestino co-cultivadas *in vitro*, e propuseram a participação da proteína β -2 integrina neste processo.

Até o presente momento, a expressão de conexinas em leucócitos é bastante relatada, contudo, a efetiva comunicação intercelular e as conseqüências fisiopatológicas desta no processo inflamatório, ainda precisa ser mais bem investigada.

2.4 GRANULOMA INDUZIDO POR SCHISTOSOMA MANSONI – MODELO EXPERIMENTAL

Granulomas provêm um alto nível de organização e justaposição de macrófagos e linfócitos T, conferindo a estas células mecanismos efetivos de coordenação da atividade inflamatória (KAUFMANN, 1993). Por outro lado, podem desorganizar e destruir o tecido parenquimatoso substituindo-o por tecido cicatricial, determinando dessa maneira, a extensão da afecção (DANNENBERG; ROOK, 1994; JAGIRDAR; ZAGZAG, 1996).
Granulomas ocorrem inicialmente como uma reação macrofágica em torno do corpo estranho, configurando-se posteriormente em uma reação de hipersensibilidade tardia tipo IV, com a participação de linfócitos T e células do tecido conjuntivo (BOROS, 1978).

As células dos granulomas induzidos por *S. mansoni* exibem intensos processos de interdigitação em nível ultra-estrutural (BOLOUKHERE; BALDO-CORREA; BOROJEVIC, 1993), conferindo estabilidade através de uma maior superfície de contato entre membranas adjacentes e, por conseguinte, maior aderência e, possivelmente, maior comunicação intercelular.

Devido à alta complexidade das interações celulares no granuloma induzido por ovos de *S. mansoni*, este modelo pode ser útil no estudo do papel da comunicação por junções do tipo *gap* no desenvolvimento da resposta inflamatória.

O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* inicia-se com os ovos eliminados com fezes. Os ovos eclodem e liberam os miracídios, que nadam e penetram no caramujo, hospedeiro intermediário específico, do gênero *Biomphalaria*. Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos originados por reprodução assexuada e a produção de cercárias. As cercárias abandonam o caramujo, estimuladas pela incidência de luz, nadam, penetram na pele do hospedeiro humano, perdem sua cauda bifurcada e tornam-se esquistossômulos. Os esquistossômulos migram por diversos tecidos e sob diferentes estágios de maturação e se alojam no sistema porta-hepático. Vermes adultos, machos e fêmeas, residem preponderantemente, nos humanos, nas vênulas mesentéricas superiores que drenam o intestino grosso. As fêmeas depositam ovos nas pequenas vênulas dos sistemas porta e perivesical. Parte dos ovos move-se progressivamente para o lúmen do intestino, atravessando o endotélio e membrana basal da veia e membrana basal e epitélio intestinal, e são eliminados com as fezes. Na infecção por *S. mansoni*, a doença crônica é o resultado da resposta do hospedeiro ao acúmulo de ovos nos tecidos. Normalmente, as lesões granulomatosas na esquistossomose murina acometem fígado, devido a embolização dos ovos nos sinusóides, intestino, e experimentalmente, granulomas extrateciduais também podem se formar na cavidade peritoneal (MELRO; MARIANO, 1987).

A patogênese da esquistossomose murina é controlada por meio de um processo imunomodulatório dependente de linfócitos T CD4⁺, e mudança da resposta Th1 para Th2 na fase crônica. Esta mudança é regulada especialmente pelas interleucinas IL-10 e IL-13 e por células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (HESSE et al., 2004; JAKUBZICK et al., 2002; TODT et al., 2000).

Durante o desenvolvimento das lesões, os granulomas manifestam alterações, não somente das populações celulares ou do perfil de citocinas, mas também no tamanho das lesões e nível de fibrose. Os granulomas são maiores durante a fase aguda da infecção tornando-se menores durante a fase crônica da doença (DOMINGO; WARREN, 1968).

A fibrose é o maior indicador da severidade da doença e está intimamente associada à resposta Th2 (HATZ, 2001). O prolongamento da resposta Th2 é o principal fator que contribui com a fibrose hepática e a morbidade na fase crônica. Neste processo, a citocina IL-13 parece ser a principal responsável pela indução da fibrose hepática. O papel fibrinogênico da IL-13, e também da IL-4, é atribuído à habilidade destas interleucinas induzirem a expressão de arginase em macrófagos, em detrimento da expressão da enzima óxido nítrico sintase-2 (HESSE et al., 2001). A arginase é uma importante enzima envolvida na produção de prolina, aminoácido essencial para a síntese de colágeno.

A IL-10 também contribui com a IL-13 e IL-4 no papel fibrinogênico, e ainda pode inibir as funções efetoras e proliferação de linfócitos T e de monócitos/macrófagos, inibir a expressão de moléculas co-estimulatórias como B7, e limitar a resposta inflamatória

(SCHANDENE et al., 1994; TAGA; MOSTOWSKI; TOSATO, 1993).

A origem do tecido conjuntivo do granuloma hepático ainda não está bem estabelecida. Alguns trabalhos sugerem a mobilização de células de Ito do tecido adjacente para compor o granuloma. Estas células expostas aos fatores inflamatórios e citocinas do microambiente do granuloma, apresentariam um fenótipo de células perissinusoidais hepáticas ativas. Demonstrou-se *in vitro* que as células perissinusoidais em fase estacionária não proliferativa, apresentam uma tendência em "retornar" ao fenótipo típico de células de Ito, com acúmulo de lipídeos (BOLOUKHERE; BALDO-CORREA; BOROJEVIC, 1993). Confirmando esta hipótese, relatou-se aumento de células positivas para desmina, identificadas com células de Ito, na região adjacente ao granuloma hepático murino e mobilizando-se para o interior da lesão (LAZOU et al., 1993).

Paradoxalmente aos efeitos deletérios, os granulomas desempenham um papel protetor essencial para o hospedeiro. Camundongos que tolerizam os antígenos de ovos de *S. mansoni* não desenvolvem granulomas, mas apresentam severo dano hepatotóxico mediado pelas hepatotoxinas secretadas pelos ovos e pelo aumento da resposta Th1. Conseqüentemente há uma diminuição da resposta Th2 e aumento da mortalidade na fase aguda (FALLON; DUNE, 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a importância da deleção de um dos alelos da conexina 43 no desenvolvimento do granuloma, experimentalmente induzido por *Schistosoma mansoni*.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar as características morfológicas e ultraestruturais dos granulomas, induzidos experimentalmente por *S. mansoni*, em camundongos $Cx43^{+/+}$ e $Cx43^{+/-}$.
- b. Estudar o desenvolvimento do granuloma por meio de morfometria dos granulomas hepáticos de 6, 8 e 12 semanas dos animais $Cx43^{+/+}$ e $Cx43^{+/-}$ infectados pelo *S. mansoni*.
- c. Quantificar a deposição de fibras colágenas na matriz extracelular e a proliferação das células no desenvolvimento do granuloma, experimentalmente induzido por *S. mansoni* em animais Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}.

- d. Detectar a expressão da conexina 43 nas células do granuloma experimentalmente induzido por *S. mansoni*, por meio de imunofluorescência, *Western blot* e RT-PCR em tempo real, em camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}.
- e. Estudar a capacidade de comunicação intercelular funcional, entre as células do granuloma dos camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, por meio do método *cut-end*.
- f. Estudar os aspectos funcionais dos monócitos/macrófagos peritoneais e circulantes: *burst* oxidativo, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, e índice de fagocitose dos animais de genótipo Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} com 8 semanas de infecção por *Schistosoma mansoni*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os camundongos deficientes em Cx43 foram originalmente estabelecidos por Reaume et al. (1995). A deficiência de um dos alelos da Cx43 foi obtida com a inserção do gene neo, de resistência à neomicina, no exon 2 da Cx43, diminuindo em 50% a expressão gênica da Cx43. Estes animais foram adquiridos dos Laboratórios Jackson (Paris) pela International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, França. Foram gentilmente doados pelo Dr. Hiroshi Yamasaki (Kanagawa - Japão) ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O *background* genético original destes camundongos era proveniente da linhagem C57BL/6, a qual foi cruzada, por sucessivas gerações, com camundongos CD1 originando animais de *background* genético CD-1. Em razão da letalidade perinatal devido à má formação cardíaca (REAUME et al., 1995) dos camundongos Cx43-knockout (Cx43^{-/-}), apenas animais heterozigotos (Cx43^{+/-}) e selvagens (Cx43^{+/+}) foram usados neste estudo.

Camundongos machos $Cx43^{+/-}$ foram cruzados com camundongos fêmeas $Cx43^{+/+}$ para obtenção de animais $Cx43^{+/+}$ e $Cx43^{+/-}$.

Os animais foram mantidos, no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em microisoladores de policarbonato forrados com maravalha autoclavada, com número máximo de 5 animais cada . Permaneceram no referido biotério em sala exclusiva com aeração, exaustão e climatização

controladas, com temperatura entre 22 e 23°C, umidade relativa de 55% e ciclo de luz noite/dia de 12h, recebendo ração Nuvilab-CR1 e água *ad libitum* autoclavadas, trocadas em intervalos de 2 dias .

Os camundongos foram utilizados de acordo com as normas do Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolo nº 50.

4.2 Certificado de Biossegurança para trabalhos com animais geneticamente modificados

O biotério do Departamento de Patologia da FMVZ – USP, bem como o Laboratório de Oncologia Experimental, possuem certificado de qualidade em biossegurança-CQB (CQB 100/02, processo nº 01200.003569/98-11), publicado no Diário Oficial da União de 25 de junho de 2002, Seção 3, página 120.

4.3 GENOTIPAGEM DOS CAMUNDONGOS

4.3.1 Extração de DNA da cauda dos camundongos

Após o desmame, aproximadamente no 21º dia de vida dos animais, foi colhido 1 fragmento de cauda de aproximadamente 1cm de cada animal. Estes fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido e permaneceram em freezer -80°C.

Para a extração de DNA, cada fragmento foi macerado e digerido em 210µl de tampão de extração (NaCl 0,1M, tris-HCl 0,05M, EDTA 0,1M, 0,2 mg/ml de proteinase K, SDS 1%) em banho-maria a 65°C durante 2 horas. Em seguida, adicionou-se 100µl de NaCl 6M, agitou-se vigorosamente e as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 3000 rpm. Cerca de 250µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo contendo 500µL de etanol absoluto a 4°C a fim de precipitar o DNA. Após a centrifugação, o DNA foi lavado em etanol 70%, posteriormente seco e ressuspendido em 100µL de tampão TE (Tris/EDTA), solubilizado à 65°C em banho-maria e armazenado a 4°C até a amplificação. Procedeu-se à quantificação, das amostras diluídas a 1:20 em água milliQ, em biofotômetro no comprimento de onda de 260/280nm.

4.3.2 Amplificação dos genes Cx43 e Neo por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Cx43 senso	5'CCCCACTCTCACCTATGTCTCC3'
Cx43 anti-senso	5'ACTTTTGCCGCCTAGCTATCCC3';
Neo senso	5'GGCCACAGTCGATGAATCCAG3'
Neo anti-senso	5'TATCCATCATGGCTGATGCAA3'

O DNA de cada camundongo foi analisado por PCR com os seguintes primers:

A PCR foi realizada nas seguintes condições de termociclagem: 1 ciclo, na condição de 94°C por 2 minutos; 35 ciclos na condição de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos; 1 ciclo a 72°C por 4 minutos; e 1 ciclo final a 4°C por 60 minutos. (YAMAKAGE et al.,1998).

O gel de agarose foi preparado na concentração de 1,5%, diluído em tampão TBE. A eletroforese foi realizada a 90W por 60 minutos, e o gel corado por 10 minutos com brometo de etídio a 0,1mg/ml.

Os genes Cx43 e neo foram visualizados e fotografados em luz UV em um aparelho Image Master Plus (Amershan Biotec).

$4.4\ \text{Modelo}\ \text{de}\ \text{esquistossomose}\ \text{murina aplicado}\ \text{aos}\ \text{camundongos}\ \text{Cx43}^{\text{+/+}}\ \text{e}\ \text{Cx43}^{\text{+/-}}$

Este trabalho foi delineado para estudarmos possíveis diferenças na resposta inflamatória crônica de animais $Cx43^{+/-}$ e $Cx43^{+/+}$ infectados por *Schistosoma mansoni*, após 6, 8 e 12 semanas de infecção. Estes tempos experimentais foram determinados segundo Dutra et al (1998) e correspondem ao início e pico da fase aguda da infecção (6 e 8 semanas, respectivamente) e início da fase crônica (12 semanas).

Assim, 120 camundongos machos foram separados em 6 grupos (6, 8 ou 12 semanas de infecção, $Cx43^{+/-}$ ou $Cx43^{+/+}$).

Na sexta semana de idade, os camundongos foram inoculados com 0,1mL de solução contendo 30 cercárias de *Schistosoma mansoni* BH-ressaca (gentilmente cedidas pelo Instituto de Medicina Tropical – SP) no subcutâneo do dorso. As cercárias foram obtidas a partir de

caramujos Biomphalaria glabrata infectados e expostos à luz.

Os animais foram pesados semanalmente e sacrificados nos tempos 6, 8, e 12 semanas após a infecção.

4.4.1 Sacrifício e colheita dos tecidos

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ou em câmara contendo CO₂, nos tempos 6, 8, e 12 semanas após a infecção. Imediatamente após o sacrificio foram colhidos: sangue, baço, fígado, e coração. Pequenos fragmentos de fígado, contendo áreas representativas de granulomas, observados macroscopicamente, foram colhidos e fixados em glutaraldeído para análise ultraestrutural. Fragmentos de tecido hepático e coração também foram congelados em nitrogênio líquido para posterior análise por RT-PCR e *Western Blot* e mantidos em freezer -80°C. Outros fragmentos foram fixados em metacarn (60% álcool metílico, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) por 8 horas, para realização de imunofluorescência da conexina 43 e imunoistoquímica para PCNA. Após este período, trocou-se a solução por álcool 95% e os fragmentos foram mantidos no álcool por, no máximo, 2 dias até a inclusão em parafina por meio de metodologia de rotina.

E por fim, fragmentos de figado fresco foram submetidos à análise de comunicação celular pelo método *cut-end* de transferência do fluorocromo *Lucifer Yellow*.

Os principais órgãos acometidos pela lesão granulomatosa (baço, figado e intestino) foram fixados em metacarn, corados em H&E e realizada morfometria das lesões hepáticas. Sangue, baço e células peritoneais foram colhidos de animais com 8 semanas de infecção para análise: do leucograma e hemograma de sangue periférico; imunofenotipagem das populações de linfócitos T esplênicas (CD3⁺ CD4⁺, CD8⁺) e B (CD19⁺), do *burst* oxidativo, e fagocitose de leucócitos circulantes por citometria de fluxo; e por metodologia colorimétrica, quantificação da produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio de leucócitos peritoneais.

4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos representativos de regiões do fígado acometidos pela inflamação granulomatosa foram colhidos para análise em microscopia eletrônica de transmissão. Para tanto, uma gota de fixador (glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) foi instilada sobre cada área de escolha e, com auxílio de lâmina, fragmentos de tecido foram excisados e imediatamente imersos no fixador. Deslizando-se duas lâminas, uma sobre outra, obtivemos cortes de no máximo 1mm de espessura, que foram mantidos em fixador por 48 horas a 4°C. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio a 1% durante 60 minutos. Posteriormente os fragmentos foram tratados pelo acetato de uranila 0,5% durante 1 noite, desidratados em acetona e incluídos em Araldite 502. Destes blocos foram obtidos cortes semifinos (200-300nm) em ultramicrótomo (MT-5000 Sorwall), que foram corados pelo azul de toluidina, e analisados em microscopia óptica para a eleição das áreas mais representativas e importantes para a análise ultra-estrutural.

Os cortes ultrafinos (60-70 nm) foram contrastados com acetato de uracila a 2% e citrato de chumbo, colocados em grades metálicas apropriadas, e observados em microscópio eletrônico de transmissão EM-201C (Philips, Holland). As eletromicrografias foram obtidas com câmera de 35mm e filme Eastman FGRP Kodak 5302. (Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini,

Laboratório de Microscopia Eletrônica, Depto Patologia, FMVZ-USP).

4.4.3 Inclusão em parafina e obtenção das lâminas histológicas

A inclusão em parafina dos fragmentos fixados em metacarn foi realizada em autoprocessador (Leica) onde receberam 2 passagens de 1 hora cada em álcool 95%, 5 passagens de 1 hora cada em álcool absoluto, 3 passagens de uma hora cada em xilol e 2 passagens de 3 horas cada em parafina histológica fundida a 60° C. Em seguida, receberam novo banho de parafina e foram emblocados manualmente. Cortes de 5µm de espessura foram colhidos em lâminas, previamente limpas e tratadas com silano. Os cortes histológicos de fígado foram corados com H&E ou Picrosirius.

4.4.3.1 Análise morfométrica dos granulomas hepáticos

A análise morfométrica foi realizada a partir de lâminas histológicas de fígado coradas em H&E, utilizando-se sistema computadorizado de análise de imagens do Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Este sistema compõe-se de um microscópio óptico Nikon E800 acoplado a uma câmara de vídeo CCD, um monitor, o computador com placa digitalizadora e o programa Image Pro-Plus. Os cortes histológicos de fígado foram analisados em microscópio Nikon E-800 com câmera CCD CoolSNAP-Pro color (Image Pro-Plus Media Cybernetics, Inc. – USA).

As áreas dos granulomas foram quantificadas em todos os cortes de tecido hepático, em objetiva 4x, delimitando-se a área correspondente à lesão. Da mesma forma, a área total dos cortes foi quantificada através de imagens colhidas em uma objetiva de aumento 0,5x. Os dados de quantificação foram representados nas formas: tamanho relativo dos granulomas, número de granulomas por área de corte e tamanho médio das lesões. O número médio das células dos granulomas também foi quantificado.

Os resultados foram expressos na forma de número de lesões e/ou células e área em μm^2 em relação à área total do corte.

4.4.3.2 Quantificação do colágeno

A quantificação do colágeno depositado nos granulomas foi realizada por meio de cortes histológicos de figado corados com Picrosirius (ANDRADE et al., 1999) e analisados sob luz polarizada em um microscópio Nikon E-800 (Tokyo, Japan). As áreas das fibras colágenas coradas, depositadas nos granulomas, foram quantificadas automaticamente, com auxílio de programa de análise de imagens Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Inc. – USA). Os dados foram representados na forma de média da porcentagem de área ocupada pelas fibras colágenas em relação à área do granuloma.

4.4.3.3 Imunoistoquímica e quantificação das células do granuloma no ciclo celular, marcadas pelo PCNA

Para a quantificação das células no ciclo celular (KELMAN, 1997; MAGA; HÜBSCHER, 2003), 5 granulomas, por animal, foram selecionados aleatoriamente. Cinco animais por genótipo foram avaliados. Anticorpos primários contra PCNA, (antígeno nuclear de proliferação celular, 1:800, *overnight*, DAKO Corporation, CA) foram aplicados, seguidos de incubação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB DAKO Corporation, CA), e coloração pela DAB (diaminobenzidina, Sigma). Todas as células, de cada granuloma, foram contadas, distinguindo-se as células com reatividade positiva das negativas. Os dados de quantificação foram representados como porcentagem de células PCNA⁺ em relação ao total de células contadas.

4.4.3.4 Imunofluorescência da conexina 43 nos granulomas hepáticos induzidos por *S. mansoni*

Cortes de figado de animais com 6, 8 e 12 semanas de infecção, foram incubados com anticorpo policional anti-Cx43 (Zymed Laboratories, CA, USA, 1:100 em solução de bloqueio do Kit TSA) *overnight* a 4°C, seguido de incubação com anticorpo secundário anti-coelho biotinilado (1:100, DAKO Corporation, CA, USA) por 2h à temperatura ambiente. A

amplificação de sinal foi realizada usando Kit TSA (Perkin Elmer, MA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Os núcleos foram corados com iodeto de propídeo (PI) (1:1000, Sigma). Os cortes foram observados em microscópio de fluorescência Nikon E-800 (Tokyo, Japão). (HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2001; TORRES, 20002)

4.4.4 Western Blot

Para a detecção da conexina 43 nos granulomas hepáticos, procedeu-se a extração de proteínas dos granulomas isolados. Para tanto, 60mg de tecido foram mecanicamente rompidos e os granulomas, isolados por meio de lavagem em PBS e sedimentações sucessivas (COKER; LICHTENBERG, 1956; PELLEGRINO; BRENER, 1956). Como controle positivo, extraiu-se proteínas de coração de camundongos Cx43^{+/+}.

Os granulomas e fragmentos de coração foram sonicados em tampão contendo 60mM Tris-HCl, pH 6.8, SDS a 2%, glicerol a 12%, ditiotreitol 0,1M e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1mM. Este homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 13.000 rpm. A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o kit Bradford (Bio-Rad) e a leitura realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Para a eletroforese, foram utilizadas 150µg de proteína total, acrescida de azul de bromofenol. As proteínas foram separadas em um gel de poliacrilamida a 13% em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 60V por 60 minutos, seguido de 200 minutos a 120V em gelo. Como marcador de peso molecular, foi utilizado 10µl de kaleidoscope padrão (Bio-Rad). Em seguida as proteínas foram transferidas em aparelho Trans-blot SD Semi-Dry transfer cell (BioRad) durante 50 minutos, a 48mA, para membranas de difluoreto de polivinilideno de 2µm (PVDF). Para a marcação da conexina 43, o anticorpo policlonal (Zymed) foi diluído 1:1000 em solução de TBS contendo 2% de leite desnatado, aplicado sobre as membranas e incubado *overnight* a 4°C sob agitação constante.

Após a incubação com anticorpos secundários de cabra anti-coelho conjugados com peroxidase (Dako), a reação foi revelada por meio do cromógeno diaminobenzidina (DAB, Sigma).

4.4.5 Detecção de RNAm de Cx43 por RT-PCR em tempo real

4.4.5.1 Extração e quantificaçãode RNA total

Para a detecção do RNAm da conexina 43 nos granulomas hepáticos, procedeu-se a extração dos granulomas do tecido hepático. Para tanto, fragmentos de figado de aproximadamente 40mg foram mecanicamente rompidos e os granulomas, isolados por meio de lavagens em PBS e sedimentações sucessivas (COKER; LICHTENBERG, 1956; PELLEGRINO, BRENER, 1956). O RNA total dos granulomas isolados foi extraído com auxílio do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

Acrescentou-se 500µl de Trizol aos granulomas em um microtubo e sonicou-se por 3 vezes até a máxima solubilização do tecido granulomatoso, restando apenas os ovos de *Schistosoma* sedimentados. Aguardou-se 5 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 250µl de clorofórmio, e os tubos foram vigorosamente agitados por 15 segundos e incubados

em temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 rpm a 4°C. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para tubos contendo isopropanol e homogeneizou-se delicadamente. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA total solubilizado em 200µl de água tratada com DEPC, e armazenado em freezer -80°.

Para a quantificação, alíquotas de RNA total foram diluídas a 1:5 em água DEPC e quantificadas em biofotômetro *Eppendorf* no comprimento de onda de 260nm. A qualidade do RNA total foi analisada em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, e as bandas 18S e 28S foram visualizadas sob luz UV.

4.4.5.2 Transcrição Reversa

Para evitarmos possível contaminação de DNA remanescente, tratamos o RNA total com DNAse I. Assim, incubamos o volume ajustado contendo $3\mu g$ de RNA total com $1\mu l$ de DNAse I (IU/ μl), $1\mu l$ de tampão de DNAse I (10x) e água DEPC (q.s.p. $10\mu l$) por 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi bloqueada adicionando-se $1\mu l$ de EDTA (25mM), seguida de incubação por 10 minutos a 65° C e banho e gelo.

Para a transcrição reversa propriamente, adicionou-se ao RNA total previamente tratado com DNAse I, 1µl de dNTP e 1µl de Oligo DT e incubou-se a 65°C por 5 minutos. Adicionou-se em seguida, 4µl de buffer 5x, 2µl DTT 1M e 1µl de RNAse OUT e incubou-se por 2minutos a 42°C. Acrescentou-se à reação 1µl de superscript II, incubou-se por 50 minutos a 42°C, seguido de incubação de 15 minutos a 37°C.

Por fim, para eliminar possíveis RNA remanescentes, que poderiam contaminar o cDNA, adicionou-se 1µl de RNAse H e incubou-se por 20 minutos a 37°C.

O cDNA foi então armazenado a -20°C até o momento da amplificação.

Todos os reagentes utilizados foram da Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA).

4.4.5.3 Amplificação e análise do cDNA por PCR em tempo real

O estudo de PCR em tempo real foi realizado em aparelho ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, USA).

Toda a metodologia aplicada foi realizada segundo instruções do fabricante e adaptada por Avanzo (2005) no laboratório de Oncologia Experimental, FMVZ-USP.

Os primers e as sondas TaqMan para Cx43 e GAPDH foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express (Applied Biosystems, USA). Assim, os primers de eleição para amplificar um fragmento de 65 pares de base do gene da Cx43 foram: sense 5' GTGCCGGCTTCACTTTCATTAAG 3', anti-sense: 3' CCAAGGCGCTCCAGTCA 5'. Os primers foram escolhidos a partir de exons separados (número de acesso do GenBank: L10387 e L10388 para os primers sense e anti-sense, respectivamente).

A sonda TaqMan para Cx43 foi desenhada segundo o fabricante Applied Biosystems (USA): FAM-3' TCTGGGCACCTCTCTTT 5'-NFQ.

Foram usados ainda os primers para amplificação de um fragmento de 55 pares de base do gene GAPDH, sense: 5' CATGGCCTTCCGTGTTCCTA 3', e anti-sense: 3' GCGGCACGTCAGATCCA 5' (GenBank NM-008084) e a sonda TaqMan : VIC-5'CCCCCAATGTGTCCGTC3'-NFQ.

As sondas TaqMan foram conjugadas à extremidade 5' com uma fluoresceína na posição 6-carboxi, fluoresceína FAM conjugada à sonda para Cx43 e VIC conjugada à sonda para GAPDH, e um quencher não fluorescente (NFQ) conjugado à extremidade 3'.

Os primers foram utilizados na concentração final de 0,9µM e as sondas, na concentração de 0,25µM. Os ciclos e condições para amplificação do cDNA foram determinados pelo programa ABI Prism Sequence Detection Systems.

O número absoluto de cópias dos RNAm das conexinas em cada amostra foi calculado com base nos seus valores de C_t (cicle threshold). O número absoluto de cópias do RNAm das conexinas foi normalizado ao da GAPDH para minimizar a variabilidade nos resultados devido à diferença na eficiência da transcrição reversa e na integridade do RNA entre as amostras testadas. A análise final da expressão relativa dos genes foi realizada segundo o método 2 - $\Delta\Delta$ ct (LIVAK et al., 2001).

4.4.6 Análise funcional de junções *gap* - incisão e transferência de fluorocromo (*Cut-End*)

A técnica *cut-end* ou IL/DT (*incision loading dye transfer*) foi realizada como previamente descrito por Tsien e Weingart (1976) e adaptado por Sai et al. (2000). Brevemente, foram realizadas 4 incisões (7-8mm comprimento) sobre a superfície do fígado, de camundongos com 12 semanas de infecção, e pingou-se a mistura de fluorocromo contendo 0,5% Lucifer Yellow (LY) e 0,5% Rodamina Dextran (RD) (Sigma) sobre os cortes. As amostras foram lavadas em solução salina, fixadas em formol diluído a 3,7% em água durante uma noite, e rotineiramente processadas para inclusão em parafina. Os cortes foram analisados em microscópio Nikon E-800 e as fluorescências do LY e da RD foram detectadas.

4.4.7 Lavado peritoneal

Para obtenção do lavado peritoneal seguiu-se a metodologia padronizada por Massoco (1998). Após a eutanásia, em câmara com CO₂, os animais foram colocados em decúbito dorsal, realizou-se assepsia local com álcool a 70%, e realizou-se uma pequena excisão na pele da região abdominal, sendo esta tracionada para que o peritônio fosse exposto. Injetou-se 5mL de solução salina estéril na cavidade abdominal e, após realização de massagem na mesma, aspirou-se o lavado resultante, dispensando-o em seguida, em tubos estéreis de polipropileno, tipo *Falcon*, mantidos em banho de gelo durante todo o procedimento experimental.

4.4.7.1 Quantificação e teste de viabilidade das células peritoneais

Após obtenção do lavado peritoneal, empregou-se 10μ L da suspensão celular e 90 μ L de Azul de Tripan. Para quantificação e teste de viabilidade, contou-se as células peritoneais viáveis e não viáveis nos quatro quadrantes externos em câmara de Neubauer. Ajustou-se o número de células presentes na suspensão para $2x10^6$ /mL, utilizando-se apenas as suspensões

com viabilidade superior a 90%.

A contagem diferencial foi feita em esfregaço corado com o método Panótico, na tentativa de verificar a diferença entre o número de células mononucleares e polimorfonucleares, para então atribuir a liberação de peróxido de hidrogênio à população preponderante. Através de microscópio óptico (Nikon), contou-se 100 células, distinguindo-se as populações leucocitárias.

4.4.7.2 Determinação do peróxido de hidrogênio

Quantificou-se a produção de H_2O_2 pelo método de oxidação da peroxidase dependente do vermelho de fenol. Essa metodologia baseou-se no método descrito por Pick e Keisari (1980), adaptado para microensaio por Pick e Mizel (1981), e modificado por Russo et al (1989).

As suspensões celulares, com o volume já ajustado para conterem $2x10^{6}$ /mL, foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10minutos, a 4°C em centrífuga refrigerada. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1mL de solução vermelho de fenol.

Baseando-se nesta técnica, utilizou-se uma placa de 96 poços de fundo chato (COSTAR®), onde se preencheu a primeira coluna com 100 μ L de solução de vermelho de fenol por poço caracterizando a coluna em branco. Nas duas colunas seguintes, colocou-se, em quadruplicata, concentrações conhecidas de H₂O₂: 5, 10, 20 e 40nM/100 μ L de solução de vermelho de fenol, caracterizando a curva padrão. Preencheu-se as demais colunas em octuplicata, com as alíquotas de 100 μ L da suspensão de células peritoneais em solução de

vermelho de fenol. Em metade dos poços, foi acrescentado 10 μ L de miristato acetato de forbol (PMA) em PBS, a fim de dosar a liberação induzida de H₂O₂.

Incubou-se a placa a 37°C em estufa contendo 5% de CO_2 e atmosfera úmida por 2 horas. Interrompeu-se a reação acrescentando 10µL de NaOH 1N por poço, transferiu-se o sobrenadante para outra placa e determinou-se a absorbância em um leitor de ELISA (Dynatech Immunoassay System®/MR 5000) com filtro de 620nm, contra branco constituído apenas por solução de vermelho de fenol. Os resultados obtidos em densidade óptica foram expressos em nM de H₂O₂, mediante equação de regressão linear com base em curva padrão feita com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

4.4.7.3 Determinação do óxido nítrico (NO)

Determinou-se a produção de NO através da medida de nitratos no sobrenadante das culturas celulares, seguindo-se a metodologia descrita por Ding et al. (1988). Os macrófagos aderidos às placas na etapa final do experimento anterior receberam 3 lavagens com tampão fosfato para retirada do vermelho de fenol. Adicionou-se 100µL de meio RPMI (acrescido de soro Fetal Bovino a 10%, Gibco) em cada poço e incubou-se as placas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 48h.

Após este período, centrifugou-se as placas e retirou-se 50µL do sobrenadante. Adicionou-se ao sobrenadante 50µL de reagente de Griess por poço e determinou-se a absorbância das amostras em leitor de ELISA (Dynatech Immunoassay System®/MR 5000), com filtro de 540nm, contra banco constituído por meio de cultura (RPMI) e reagente de Griess. Os resultados foram expressos em nM de NO_2^- , mediante equação de regressão linear com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de nitrato de sódio (NaNO₂): 5, 10, 30 e 60 nM/100µL de meio RPMI e 50µL de reagente de Griess.

4.4.8 Coleta de sangue, leucograma e contagem diferencial

Amostras de 1mL de sangue foram colhidas após decapitação e subseqüentemente armazenadas com heparina (250µg) e sobre gelo.

Os valores RBC (red blood cells) e WBC (white blood cells) foram automaticamente quantificados, em contador de células (CELM CC550), e a contagem diferencial dos leucócitos sanguíneos obtida analisando-se 100 células em esfregaço corado com Giemsa.

4.4.8.1 Citometria de fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador Machintosh (Apple, CA, USA). Foram adquiridos e analisados 10.000 eventos por ensaio .

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – *Foward Scatter* e SSC - *Side Scatter*, que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. As fluorescências foram adquiridas em escala logarítmica para a avaliação de *burst* oxidativo, fagocitose e moléculas de superfície celular. A fluorescência do DCFH e FITC foi detectada pelo leitor FL-1 (530±30nm), a do PE e Iodeto de Propídeo ou SAPI foi detectada pelo leitor FL-2 (585±42nm).

Foram analisadas através do programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) as populações de interesse em cada experimento (linfócitos, macrófagos ou neutrófilos) foram delimitadas por meio de *gates*. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo *branco* como controle de refringência basal das células a serem analisadas.

4.4.8.1.1 Imunofenotipagem da população de linfócitos esplênicos

Para avaliação das moléculas de superfície celular, o baço foi coletado e macerado em solução de meio RPMI (suplementado com HEPES 10mM, NaHCO₃ 24mM, 10 U/ml de penicilina, 10 μ g/ml de estreptomicina, 0,5 Ug/ml de anfotericina B) enriquecido com 5 % soro fetal bovino estéril. As células foram diluídas em Azul de Tripan (diluição 1:10) e contadas em Câmara de Neubauer, sendo ajustadas a uma concentração de 1 x 10⁶ células/tubo em um volume de 100 μ l.

Foram empregados os seguintes anticorpos monoclonais conjugados à fluoresceína ou ficoeritrina: anti-CD3 para detectar linfócitos T; anti-CD4 para linfócitos TCD4+ e alguns macrófagos ativados; anti-CD8 para detectar linfócitos TCD8+ e anti-CD19 para detectar linfócitos B. As amostras foram incubadas no escuro, a temperatura ambiente, durante 1 hora com os diferentes anticorpos Após este período, as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de PBS para avaliação no citômetro de fluxo (FACScan, Becton

Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

A análise foi realizada por meio do programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). As células que estavam marcadas duplamente pelo anti-CD3 e anti-CD4 foram consideradas como linfócitos T helper, as marcadas pelo anti-CD8 como linfócitos T citotóxicos e as marcadas pelo anti-CD19 como linfócitos B. Os resultados foram expressos em porcentagem de células, calculada através do número de linfócitos fluorescentes dividido pelo número total destas células x 100.

As análises foram processadas a partir de 7 animais Cx43^{+/+} e outros 9 animais Cx43^{+/-}

4.4.8.1.2 Ensaio de burst oxidativo e fagocitose pela citometria de fluxo

O *burst* oxidativo é medido indiretamente pela oxidação do reagente DCFH-DA no citoplasma das células. Uma vez oxidado, o radical DA é liberado, emitindo fluorescência verde que pode ser captada pelo citômetro de fluxo.

A capacidade de fagocitose é estimada pela detecção de bactérias fagocitadas. Para que seja possível a detecção pelo citômetro de fluxo, as bactérias foram previamente conjugadas ao iodeto de propídeo, que emite fluorescência vermelha.

Tanto a fagocitose quanto o *burst* oxidativo podem ser estimulados *in vitro* por PMA, um conhecido ativador de PKC (VOSPER; KHOUDOLI, PALMER, 2003).

Assim, amostras de 0,5mL de sangue foram obtidas da veia cava dos camundongos com auxílio de seringas e agulhas previamente umedecidas em heparina. Incubou-se amostras de 100µl de sangue com os respectivos reagentes: DCFH-DA; *S. aureus* conjugado ao iodeto de propídeo; ou DCFH + PMA; DCFH + *S. aureus*, por 20 minutos, a 37°C, sob agitação

constante. As hemácias foram lisadas com solução hipotônica de NaCl a 0,2% seguida de solução hipertônica de NaCl a 1,6%. As amostras foram centrifugadas e o *pellet* ressuspenso em 1mL de EDTA(3mM) em PBS gelado.

Imediatamente as amostras foram submetidas à detecção das fluorescências verde e vermelha de DCFH e PI, respectivamente, para a estimação da fagocitose e *burst* oxidativo, como proposto por Hasui et al. (1989) e modificado por Massoco e Palermo-Neto (2003).

Todos os dados foram analisados por meio do programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). Os dados, oriundos do experimento de *burst* oxidativo, foram expressos na forma de média geométrica. A fagocitose foi expressa na forma de porcentagem de células que ingeriram as bactérias (*S. aureus* conjugada ao iodeto de propídeo).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos na forma de média, seguidos por seu respectivo desvio padrão (SD). Os gráficos apresentam dados de média e erro médio (SEM).

Para a análise do ganho de peso dos camundongos foi utilizado teste de análise de variância ANOVA de duas vias com nível de significância de 5%. Para os demais resultados, o teste estatístico utilizado foi o de Bartelett, para se verificar a homocedasticidade dos dados, seguido do teste t-Student para os valores considerados paramétricos, ou Mann-Whitney para os valores considerados não paramétricos.

5 RESULTADOS

5.1 ANIMAIS

A genotipagem dos animais nos permite distinguir os camundongos portadores de dois alelos de Cx43 (Cx43^{+/+}) ou portadores de 1 alelo de conexina (Cx43^{+/-}). Dessa forma, como podemos ver na figura 2, os camundongos Cx43^{+/+} apresentam apenas 1 banda correspondente aos 2 alelos de Cx43, enquanto o animal deficiente Cx43^{+/-} apresenta 1 banda correspondente à Cx43 e outro alelo correspondente ao gene neo (gene de resitência à neomicina).

O peso absoluto dos camundongos variou significantemente com o tempo ($p\leq0,0001$) e também entre os genótipos ($p\leq0,05$) (Figura 3). Entretanto, não obtivemos diferenças entre os genótipos em cada tempo analisado individualmente (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra que os pesos absolutos do figado dos camundongos infectados com *S. mansoni* não apresentaram diferenças dignas de nota entre os genótipos, mas apenas em relação ao tempo (DF=2, F= 4,508, p \leq 0,05, ANOVA de duas vias). Da mesma forma, os pesos do timo (DF=2, F=3,468, p \leq 0,05, ANOVA de duas vias) e os pesos do baço (DF=2, F= 18,5, p \leq 0,0001, ANOVA de duas vias) variaram apenas em relação ao tempo de infecção.



Figura 2 - Gel de agarose mostrando os genes amplificados da Cx43 (520pb) e neo (294pb)

Tabela 3 - Ganho de peso dos animais	$Cx43^{+/+}$ e	$Cx43^{+/-}$	infectados	com S. 1	mansoni.	(média ±
desvio padrão)						

Semanas	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}
0	27,29 ± 2,02 (n= 25)	27,43 ± 2,80 (n= 24)
2	28,88 ± 3,07 (n= 30)	29,94 ± 2,98 (n= 24)
4	32,14 ± 3,34 (n= 30)	33,35 ± 3,13 (n= 24)
6	34,24 ± 3,36 (n= 30)	35,30 ± 3,49 (n= 24)
8	33,80 ± 4,15 (n= 21)	33,88 ± 3,97 (n= 14)
12	31,52 ± 5,58 (n= 10)	33,36 ± 3,19 (n= 8)



Figura 3 - Ganho de peso dos animais Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} infectados com *S. mansoni*. (média ± SEM). As médias dos pesos entre os genótipos (Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}) variaram de forma estatisticamente significantemente (F=4,02, DF=1, p<0,05), assim como o tempo afetou o resultado (F=26,22, DF=5, p<0,0001). (ANOVA de duas vias)</p>

	6 semanas		8 sem	anas	12 semanas		
	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}	
	n= 8	n= 8	n= 10	n= 6	n= 8	n= 6	
Fígado	$1,99 \pm 0,24$	$2,22 \pm 0,38$	$2,34 \pm 0,29$	2,65 ± 0,59	2,49 ± 0,63	$2,63 \pm 0,48$	
Baço	$0,13 \pm 0,02$	0,14 ± 0,03	$0,24 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,1$	$0,\!27 \pm 0,\!09$	
Timo	$0,05 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,02$	

Tabela 4 - Pesos absolutos de fígado, baço e timo de animais com 6, 8 ou 12 semanas de infecção por S. mansoni (média ± desvio padrão)

5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MICROCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

O pico de desenvolvimento dos granulomas induzidos por *S. mansoni*, em camundongos, ocorre na oitava semana de infecção. Dessa forma, podemos ver na figura 4 o aspecto macroscópico do fígado de um animal com 8 semanas de infecção, com granulomas distribuídos em todos os lóbulos hepáticos.

A análise histopatológica revelou que as células constituintes dos granulomas eram predominantemente mononucleres, e poucos granulócitos polimorfonucleares, sobretudo eosinófilos. Animais de ambos genótipos apresentaram densa deposição de fibras de colágeno na matriz extracelular dos granulomas de 8 e 12 semanas de infecção e mais intensamente nos animais Cx43^{+/-} com 12 semanas de infecção. Como podemos notar na figura 7, animais Cx43^{+/-} apresentam um padrão mais denso de lesão em relação aos animais Cx43^{+/-}. Estes por sua vez, apresentam um padrão frouxo de lesão, com maior deposição de colágeno na matriz extracelular (Figura 8).

Estes achados foram confirmados pela microscopia eletrônica. A figura 11A mostra vários macrófagos e um eosinófilo no centro da imagem, e densa deposição e colágeno na matriz extracelular.

Junções do tipo *gap* não foram encontradas por análise de microscopia eletrônica, apenas interdigitações de membrana plasmática de macrófagos, como ilustra figura 11B.

No que concerne à vulnerabilidade dos animais ao desenvolvimento da doença, não encontramos nenhuma diferença entre os animais $Cx43^{+/+}$ e $Cx43^{+/-}$ (Dados não apresentados).



Figura 4 - Aspecto macroscópico do fígado de um animal com 8 semanas de infecção por *S. mansoni*. Notar a presença de granulomas distribuídos em todos os lóbulos hepáticos



Figura 5 - Fotomicrografia de granuloma hepático de camundongo. A) Cx43^{+/+} infectado há 6 semanas com *S. mansoni*. H&E, objetiva 10x



Figura 6 - Fotomicrografia de granuloma hepático de camundongo. A) Cx43^{+/-} infectado há 6 semanas com *S. mansoni*. H&E, objetiva 10x



Figura 7 - Fotomicrografia de granuloma hepático de camundongo. A) Cx43^{+/+} com 8 semanas de infecção por *S. mansoni*. Notar padrão denso da lesão. H&E, objetiva 10x



Figura 8 - Fotomicrografia de granuloma hepático de um camundongo Cx43^{+/-} com 8 semanas de infecção por *S. mansoni*. Notar padrão frouxo de lesão e fibroplasia. H&E, objetiva 10x



Figura 9 - Fotomicrografia de granuloma hepático de um camundongo Cx43^{+/+} com 12 semanas de infecção por *S. mansoni*. H&E, objetiva 10x



Figura 10 - Fotomicrografia de granuloma hepático de um camundongo Cx43^{+/-} com 12 semanas de infecção por *S. mansoni*. Notar padrão frouxo de lesão e intensa fibroplasia. H&E, objetiva 10x



Figura 11 - Eletrofotomicrografia de granuloma hepático de um animal com 8 semanas de infecção por S.mansoni. (A) A seta aponta um macrófago, dentre outros, e o asterisco indica um eosinófilo no centro da lesão (aumento de 4500X); (B) a seta grossa aponta região de interdigitação de membranas plasmáticas de macrófagos e, a seta fina aponta região de densa deposição de fibras colágenas na matriz extracelular (aumento de 5000X)

5.3 MORFOMETRIA DOS GRANULOMAS

A análise morfométrica dos granulomas hepáticos não revelou diferenças dignas de nota entre os genótipos (Tabela 5 e Figura 12). Em todos os parâmetros avaliados, exceto número de células do granuloma, o tempo de infecção afetou os resultados (ANOVA de duas vias, p≤0,05).
	6 semanas		8 semanas		12 semanas	
	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}	Cx43 ^{+/+} Cx43 ^{+/-}		Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}
	n= 6	n= 5	n= 8	n= 6	n= 8	n= 9
Nº granulomas/Área x 10 ⁻⁷	$0,52 \pm 0,32$	0,75 ± 0,27	3,82 ± 3,25	3,66 ± 2,35	4,45 ± 2,07	5,15 ± 2,33
Área dos granulomas x 10^4	5,05 ± 6,14	7,11 ± 4,92	8,89 ± 3,28	9,37 ± 1,39	$7,89 \pm 2,89$	7,56 ± 1,74
Área relativa dos granulomas (%)	0,29 ± 0,6	$0,38 \pm 0,40$	3,73 ± 3,04	3,29 ± 1,32	$3,89 \pm 2,44$	3,98 2,41
Nº células/granuloma	nd	nd	9,94 ± 2,99	10,57 ± 1,72	8,47 ± 1,29	8,72 ± 1,78

Tabela 5 - Análise morfométrica dos granulomas hepáticos dos camundongos infectados há 6, 8 ou 12 semanas com aproximadamente 30cercárias de S. mansoni. (média ± desvio padrão)

Nd= não determinado



Figura 12 - Quantificação dos granulomas hepáticos com 6, 8 e 12 semanas de infecção por *S. mansoni*. Os dados são representados na forma de média ± SEM de 8 animais por genótipo e por tempo, exceto o número de células que são representadas na forma de média ± SEM de 5 granulomas selecionados aleatoriamente e provenientes de 5 animais por genótipo e por tempo. (A) Número de granulomas, em relação à área total do corte; (B) Tamanho médio das lesões; (C) Tamanho do granuloma em relação à área total do corte; (D) Número médio de células por granuloma

A evolução dos granulomas hepáticos é caracterizada pela progressiva organização da matriz extracelular, com significante aumento da birrefringência do colágeno (ANDRADE et al., 1999).

No presente estudo, a deposição do colágeno, revelada pela coloração Picrosirius e analisada sob microscópio de luz polarizada, foi intensa nos camundongos $Cx43^{+/-}$ com 12 semanas de infecção (Figura 13D). Como apresentado na figura 14, os granulomas dos camundongos $Cx43^{+/-}$ com 12 semanas de infecção apresentaram áreas fibróticas maiores (p \leq 0,05). Como esperado, as lesões provenientes dos camundongos com 12 semanas de infecção foram mais fibróticas em comparação àquelas encontradas nos camundongos com 8 ou 6 semanas de infecção (Figura 14). Camundongos com 6 semanas de infecção apresentaram fibras colágenas com pouco ou nenhuma birrefringência, insuficientes para quantificação.



Figura 13 - Fibras colágenas nos granulomas de 8 e 12 semanas de infecção por S. *mansoni*, coradas com Picrosirius e sob luz polarizada. (A) Camundongos Cx43^{+/+} com 8 semanas de infecção; (B) Camundongos Cx43^{+/-} com 8 semanas de infecção; (C) Camundongos Cx43^{+/+} com 12 semanas de infecção; (D) Camundongos Cx43^{+/-} com 12 semanas de infecção. Objetiva 10X



Figura 14 - Quantificação das fibras colágenas nos granulomas, de 8 e 12 semanas de infecção por S. *mansoni*, corados com Picrosirius, foi realizada automaticamente com auxílio do programa *Image Pro Plus*. Os valores são representados na forma de área média das fibras colágenas coradas com Picrosirius em relação à área do granuloma. Dados são apresentados na forma de média ± desvio padrão. *Teste Mann Whitney, p≤ 0,05 em comparação ao camundongo Cx43^{+/+} com 12 semanas de infecção

5.5 QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Na esquistossomose murina crônica a proliferação e diferenciação das células mielóides, no parênquima hepático e nos granulomas periovulares, pode ser mediada pelo microambiente do granuloma (ALVAREZ-SILVA; DA SILVA; BOROJEVIC, 1993).

Como ilustrado na figura 15, parte dos núcleos das células dos granulomas apresentou marcação positiva para PCNA. A baixa incidência de lesões apresentadas pelos animais com 6 semanas de infecção não nos possibilitou realizar análise estatística.

O índice da proliferação das células dos granulomas foi significantemente menor nos animais deficientes em Cx43 com 8 ou 12 semanas de infecção, ($p \le 0,05$) (Tabela 6 e Figura 16) indicando uma menor capacidade proliferativa destas células em comparação aos camundongos selvagens.



Figura 15 - Fotomicrografia evidenciando marcação por imunoistoquímica do PCNA de células do granuloma induzido por *S. mansoni*. (A) Camundongos Cx43^{+/+} com 8 semanas de infecção; (B) camundongos Cx43^{+/-} com 8 semanas de infecção; (C) camundongos Cx43^{+/+} com 12 semanas de infecção; (D) camundongos Cx43^{+/-} com 12 semanas de infecção; (E) Detalhe em maior aumento da marcação. Objetiva 20x

	8 semanas		12 se	12 semanas	
	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}	
	n= 5	n= 5	n= 7	n= 6	
Células PCNA ⁺	62 40 + 2 72	50 47 + 6 74*	59 26 + 9 50	49 40 + 7 47*	
(%)	$03,40 \pm 3,72$	$32,47 \pm 0,74^{+}$	38,30 ± 8,39	$40,40 \pm 7,47^{*}$	

Tabela 6 - Quantificação do índice de proliferação das células do granuloma de camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, com 8 e 12 semanas de infecção por *S. mansoni*

*t-test p≤ 0,05 em comparação aos camundongos Cx43^{+/}

Os valores representam a porcentagem de células do granuloma $PCNA^+$ em relação ao número total de células do granuloma. Dados são representados pela média \pm SD de % de células $PCNA^+$ de 5 granulomas de cada camundongo.



Figura 16 - Quantificação do índice de proliferação, representado pelo número de células do granuloma PCNA⁺ em relação ao número total de células do granuloma induzido por *S. mansoni*, 8 e 12 semanas pós-infecção. Dados são representados pela média ± SEM de células PCNA⁺ de 5 granulomas de cada camundongo, n=5. *t-test p≤ 0,05 em comparação aos camundongos Cx43^{+/+}

5.6 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CX43 E CX32

A proteína Cx43 foi detectada, por imunofluorescência, nas células dos granulomas provenientes dos camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} (Figura 17).

Em todos os tempos experimentais os camundongos Cx43^{+/-} (Figuras 17B, 17D e 17F) apresentaram menor expressão da proteína Cx43 em comparação aos camundongos Cx43^{+/+} (Figuras 17A, 17C, 17E).

Em relação à evolução geral do granuloma, a expressão da proteína Cx43 foi maior na fase crônica da doença, culminando com a mais densa marcação de placas juncionais no tempo de 12 semanas de infecção (Figura 17E).

A figura 18 ilustra, em detalhe, a marcação da Cx43 nas células do granuloma de animais Cx43^{+/+} com 8 (Figura 18A) ou 12 (Figura 18B) semanas de infecção. Podemos notar que a marcação obtida é citoplasmática e também puntiforme na membrana plasmática. Podemos observar também marcação de Cx43 em célula ductal no ducto biliar, como esperado (Figura 18C).

A marcação da Cx32 foi, predominantemente, puntiforme e encontrada na membrana plasmática de hepatócitos. A fotomicrografia de imunofluorescência de Cx32 ilustrada na figura 19 mostra a presença de Cx32 entre os hepatócitos sob forma puntiforme (Figura 19A) e, mesmo entre hepatócitos remanescentes no interior da lesão granulomatosa (Figura 19B).

O *imunoblot* dos granulomas isolados mostra ligeiro aumento de intensidade de marcação das bandas de Cx43, provenientes de camundongos $Cx43^{+/+}$ em relação aos granulomas de animais $Cx43^{+/-}$ (Figura 20).



Figura 17 - Expressão da Cx43 nas células do granuloma. (A) Camundongos Cx43^{+/+} 6 semanas pós-infecção; (B) camundongos Cx43^{+/-} 6 semanas pós-infecção; (C) camundongos Cx43^{+/+} 8 semanas pós-infecção; (D) camundongos Cx43^{+/-} 8 semanas pós-infecção; (E) camundongos Cx43^{+/-} 12 semanas pós-infecção e, (F) camundongos Cx43^{+/-} 12 semanas pós-infecção. Setas mostram a marcação da Cx43, cabeças de seta mostram ovos de *S. mansoni*. Os núcleos foram corados com iodeto de propídeo. Objetiva 20x



Figura 18 - Imunofluorescência da Cx43 evidenciando marcação, em verde, puntiforme membranar e citoplasmática. (A) Camundongos Cx43^{+/+} com 8 semanas de infecção; (B) camundongos Cx43^{+/+} com 12 semanas de infecção, (C) Ducto biliar de camundongo Cx43^{+/+}, a seta indica a marcação da Cx43. Os núcleos foram corados com iodeto de propídeo. Objetiva 100x





Figura 19 - Expressão da Cx32 representada pela marcação em verde nas células do granuloma de camundongo Cx43^{+/-} com 8 semanas de infecção. (A) Marcação membranar e puntiforme de Cx32 em hepatócitos; B) marcação de Cx32 entre hepatócitos no interior de um granuloma; C) detalhe da imagem anterior. Setas mostram a marcação da Cx32, cabeça de seta mostra ovo de *S. mansoni* no centro do granuloma. Objetiva 20x



Figura 20 - *Imunoblot* da Cx43, de proteínas extraídas dos granulomas de 8 semanas de infecção, provenientes de animais Cx43^{+/+} (2-5), de animais Cx43^{+/-} (6-9) e controle positivo de proteínas extraídas de coração (1)

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA DA CX43

A análise do PCR em tempo real é realizada avaliando-se as diferenças entre os ciclos de amplificação. O C_T (cicle theshold) é o número do ciclo de amplificação no início da fase exponencial da PCR, e é determinado a partir de um gráfico com uma curva logarítmica do sinal de amplificação do gene. Assim, C_T é um termo exponencial e não linear. Por essa razão, nenhuma apresentação estatística usando os valores absolutos de C_T é válida.

Quanto maior a expressão gênica, menores são os valores de Ct.

A diferença entre os ciclos indica que o gene constitutivo GAPDH, usado como controle endógeno, apresentou valor de Ct 13 vezes maior que os valores de Ct da Cx43, tanto nos animais $Cx43^{+/+}$ quanto nos animais $Cx43^{+/-}$ (Tabela 7).

Assim, o gene da Cx43 começou a amplificar, em média, no ciclo 36, enquanto o GAPDH iniciou a amplificação no ciclo 22. (Dados não apresentados)

Como o GAPH não variou entre os grupos, como desejado para o controle endógeno, analisamos a quantidade relativa de expressão de Cx43 normalizada em relação ao GAPDH.

Como mostrado na tabela 7, granulomas isolados apresentaram expressão do gene da Cx43 e, camundongos $Cx43^{+/-}$ têm, aproximadamente, 40% da expressão do gene da Cx43.

	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}
	n= 5	n= 4
Diferença em ciclos (<i>Ct</i>) entre Cx43 e GAPDH	13,08 ± 2,94	14,35 ± 3,09
Quantidadade normalizada de Cx43 em relação aos camundongos Cx43 ^{+/+}	1	0,41

Tabela 7 - Níveis de RNAm de Cx43 nos granulomas isolados, determinados por RT-PCR em tempo real quantitativo

Análise de PCR quantitativo pelo sistema TaqMan da expressão do transcrito Cx43, em granulomas isoladados, com 8 semanas de infecção por *S. mansoni*. Usando transcriptase reversa, cDNA foi sintetizado a partir de $3\mu g$ de RNA total. Alíquotas de cDNA foram usadas nas reações de PCR em tempo real com *primers* e *probe* para Cx43 e *primers* e *probe* para GAPDH (controle endógeno). Os dados são apresentados como valores de média de reações em duplicata e de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta c}t$, e a diferença em ciclos entre Cx43 e GAPDH (Média ± SD).

5.8 TRANSFERÊNCIA DO FLUOROCROMO LUCIFER YELLOW

Todas as lesões granulomatosas, analisadas no tempo de 12 semanas de infecção, apresentam comunicação funcional entre as células do granuloma, indicado pela difusão do fluorocromo *Lucifer Yellow* a partir da superfície de corte.

A técnica *cut-end* permitiu-nos observar a comunicação funcional entre as células e supor que a capacidade de comunicação intercelular (GJIC) nas células dos granulomas provenientes dos camundongos $Cx43^{+/-}$ tenha sido ligeiramente menor em relação aos granulomas dos animais $Cx43^{+/+}$ com 12 semanas de infecção.

Como podemos notar na figura 21A, houve plena difusão do corante LY a partir do corte, indicado em asterisco, entre as células de 2 granulomas contíguos de camundongos Cx43^{+/+}. Na figura 21B, notamos que a difusão do corante LY é diminuída, e que não há difusão do corante entre os 2 granulomas mostrados na fotomicrografia. Na figura 21C, observamos, em maior detalhe, a difusão do corante LY, e na figura 21D visualizamos a transferência do corante RD, limitada à superfície de corte.



Figura 21 - Transferência dos fluorocromos *Lucifer Yellow* (LY) e Rodamina Dextran (RD) pela técnica de *cut-end* no figado de camundongos com 12 semanas de infecção por *S. mansoni*. Os asteriscos mostram o ponto inicial de difusão dos corantes e as cabeças de setas apontam os ovos de *S. mansoni* refringentes. A) Camundongos Cx43^{+/+}, objetiva 10x; (B) camundongos Cx43^{+/+}, objetiva 10x; (C) detalhe em maior aumento do granuloma de um animal Cx43^{+/+} mostrando ampla difusão do corante LY pelas células, objetiva 20x; (D) Imagem anterior mostrando a difusão do corante RD apenas na superfície do corte. Objetiva 20x

5.9 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS SANGÜÍNEAS E POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS

Os valores de RBC (red blood cells) e WBC (white blood cells), bem como a contagem diferencial de leucócitos, não diferiram entre os animais de ambos genótipos com 8 semanas de infecção (Tabelas 8 e 9).

Não foram encontradas diferenças entre os linfócitos esplênicos CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD19⁺ provenientes dos animais Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} com 8 semanas de infecção. Também não se observaram diferenças na população de linfócitos esplênicos entre os animais que desenvolveram ou não os granulomas induzidos por *S. mansoni*. (Tabela 10).

A produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio *in vitro* pelos macrófagos peritoneais também não mostraram diferenças estatisticamente significantes (Tabela 11).

Animais	Cx43 +/+	Cx43+/-
	n=12	n=9
RBC (nº x 10 ⁶ /mm ³)	6,86 ± 1,19	6,31 ± 2,11
HCT (%)	$43,94 \pm 7,76$	$40,34 \pm 13,44$
MCV (µэ)	$64,09 \pm 2,84$	$63,93 \pm 1,47$
WBC (nº x 10 ³ /mm ³)	8,67 ± 3,22	9,11±3,03

Tabela 8 - Hemograma dos camundongos Cx43+/+ e Cx43+/- com 8 semanas de infecção por *S. mansoni*. (média ± desvio padrão)

n=número de animais utilizados

		$Cx43^{+/+}$ n= 6	$Cx43^{+/-}$ n=4
Leucócitos	$(n^{o}x10^{3}/mm^{3})$	8,3 ± 2,47	$7,67 \pm 0,96$
Linfócitos	(%)	35,78	34,29
	(n°x10 ³ /mm ³)	2,97 ± 1,62	2,63 ± 1,01
Neutrófilos	(%)	55,30	54,89
	(n°x10 ³ /mm ³)	4,59 ± 1,45	4,21 ± 1,64
Monócitos	(%)	26,26	5,74
	(n°x10 ³ /mm ³)	$2,18 \pm 3,82$	$0,44 \pm 0,47$
Eosinófilos	(%)	5,18	4,95
	(n°x10 ³ /mm ³)	0,43 ± 0,77	0,38 ± 0,17

Tabela 9 - Leucograma e contagem diferencial dos leucócitos de camundongos $Cx43^{+/+}$ e $Cx43^{+/-}$ com 8 semanas de infecção por *S. mansoni*. (média ± desvio padrão)

n=número de animais utilizados

*p<0,05, t-test.

Tabela 10 - Citometria de fluxo de linfócitos esplênicos de camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} com 8 semanas de infecção por *S. mansoni*. (média ± desvio padrão)

	Com granulomas		Sem granulomas	
Linfócitos	$Cx43^{+/+}$ n= 5	$Cx43^{+/-}$ n= 5	Cx43 ^{+/+} n= 3	$Cx43^{+/-}$ n= 4
CD3 ⁺ CD4 ⁺	$10,71 \pm 1,74$	10,61 ± 2,07	10,94 ± 1,54	9,11 ± 1,36
$CD8^+$	1,24 ± 0,23	$1,\!28\pm0,\!29$	$1,85 \pm 0,41$	1,51 ± 0,16
CD19 ⁺	72,84 ± 7,43	71,76 ± 10,64	75,82 ± 6,42	77,83 ± 1,35

Tabela 11 - Número de macrófagos peritoneais, e liberação de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, induzido por PMA, na primeira hora de incubação, por 2x10⁶ macrófagos peritoneais de camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, com 8 semanas de infecção por *S. mansoni*. (média ± desvio padrão)

Animais	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}
nº de macrófagos x 10 ⁶ /mL	2,429 ± 1,125 (n=11)	3,456 ± 2,128 (n=8)
NO (nM/L)	18,058 ± 6,875 (n=8)	15,768 ± 1,698 (n=5)
$H_2O_2(nM/L)$	14,352 ± 5,198 (n=9)	15,492 ± 3,931 (n=6)

n=número de animais utilizados

5.10 BURST OXIDATIVO DE MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS

Para estudar possíveis implicações da expressão da conexina 43 na resposta imune de forma sistêmica, realizou-se experimento independente para investigar o *burst* oxidativo dos leucócitos sangüíneos.

Os dados distinguem o *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos (Tabela 12) e monócitos (Tabela 13), assim como dos animais que apresentaram ou não granulomas hepáticos na análise macroscópica. Não foram encontradas diferenças na susceptibilidade dos animais de ambos genótipos à infecção por *S. mansoni*. As tabelas 12 e 13 mostram que neutrófilos ou monócitos, dos animais Cx43^{+/-} que desenvolveram os granulomas, tiveram níveis maiores de *burst* oxidativo induzido por PMA em comparação aos animais selvagens ($p \le 0,05$).

Interessante notar que o *burst* oxidativo dos monócitos/macrófagos de animais Cx43^{+/-}, que não desenvolveram lesões, não sofreu alteração em resposta ao estímulo PMA (Tabela 13). Entretanto, o *burst* (DCFH + PMA) dos neutrófilos ativados destes mesmos animais foi significantemente maior (Tabela 12).

O *burst* oxidativo induzido por *S. aureus*, bem como o ensaio de fagocitose da mesma bactéria, não apresentou alterações entre os grupos (Tabelas12 e13).



Figura 22 - Burst oxidativo de leucócitos circulantes de camundongos com 8 semanas de infecção por S. mansoni. A) Dot Plot de leucócitos baseado na s propriedades forward scatter (FSC) e side scatter (SSC), quadrante 1 sobre a população de neutrófilos e quadrante 2 sobre a população de monócitos; B) histograma de fluorescência FL1, em escala logarítmica, correspondente ao burst oxidativo de monócitos; C) histograma de fluorescência FL1, em escala logarítmica, correspondente ao burst oxidativo de neutrófilos



Figura 23 - Burst oxidativo de leucócitos circulantes de camundongos com 8 semanas de infecção por S. mansoni. A) Dot Plot de leucócitos baseado nas propriedades forward scatter (FSC) e side scatter (SSC), quadrante 1 sobre a população de neutrófilos ativados; B) histograma de fluorescência FL1, em escala logarítmica, correspondente ao burst oxidativo de neutrófilos ativados

	Com grat	nulomas	Sem granulomas	
Neutrófilos	$Cx43^{+/+}$ n=4	$Cx43^{+/-}$ n= 5	$Cx43^{+/+}$ n= 3	$Cx43^{+/-}$ n=4
DCFH	62,85 ± 2,58	54,04 ± 26,17	57,39 ± 16,34	68,99±11,91
DCFH + PMA	46,56 ± 9,23	85,8 7 ± 27,27*	46,67 ± 1,96	$48,99 \pm 5,95$
DCFH + PMA (neutrófilos ativados)	112,94 ± 39,73	195,68 ± 64,20	79,37 ± 35,91	139,51 ± 13,22**
DCFH + S. aureus	137,84 ± 46,27	$128,19 \pm 48,78$	89,41 ± 10,45	108,91 ± 13,68
Fagocitose de S. aureus	12,15±0,18	13,52 ± 3,39	13,87 ± 2,79	$12,99 \pm 1,92$

Tabela 12 - Citometria de fluxo de neutrófilos de sangue de camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} com 8 semanas de infecção por *S. mansoni*

* p \leq 0,05, t-test em relação aos animais Cx43^{+/+} com granulomas; ** p \leq 0,05, t-test em relação aos animais Cx43^{+/+} sem granulomas.

Os dados são apresentados na forma de média ± desvio padrão. Os valores do *burst* oxidativo são expressos na forma de média geométrica, e a fagocitose é expressa na forma de porcentagem de células que fagocitaram bactérias *S. aureus*.

Tabela 13 - Citometria de fluxo de monóo	citos de sangue de camundongos Cx	$43^{+/+}$ e Cx43 ^{+/-}	² com 8 semanas de infecção por	S. mansoni. (média ±
desvio padrão)				

	Com granu	ılomas	Sem granulomas	
Monócitos	$Cx43^{+/+}$ n= 4	$Cx43^{+/-}$ n= 4	$Cx43^{+/+}$ n= 3	$Cx43^{+/-}$ n= 4
DCFH	19,03 ± 2,88	27,31 ± 13,43	30,76 ± 18,32	24,25 ± 6,45
DCFH + PMA	22,95 ± 2,50	60,01 ± 26,98*	26,54 ± 11,54	27,26 ± 8,84
DCFH + S. aureus	75,77 ± 32,59	74,97 ± 30,50	44,99 ± 13,88	55,71 ± 16,47
Fagocitose de S. aureus	13,29 ± 1,36	21,64 ± 19,32	11,65 ± 6,73	11,52 ± 1,50

* p<0,05, t-test em relação aos animais Cx43 $^{\scriptscriptstyle +\!/\!+}$ com granulomas.

Os dados são apresentados na forma de média ± desvio padrão. Os valores do *burst* oxidativo são expressos na forma de média geométrica, e a fagocitose é expressa na forma de porcentagem de células que fagocitaram bactérias *S. aureus*.

6 DISCUSSÃO

A Cx43 é amplamente encontrada no sistema imune e nas células da medula óssea (OVIEDO-ORTA; EVANS, 2004; WONG; CHRISTEN; KWAK, 2004) Macrófagos expressam Cx43, e sua expressão tem sido correlacionada à ativação por LPS, IFN- γ e TNF- α (EUGENÍN et al., 2003; JARA; BORIC; SÁEZ, 1995). Entretanto, o papel da comunicação celular intercelular na função macrofágica ainda é controverso. Assim, consideramos o granuloma um bom modelo experimental para esclarecermos a comunicação intercelular entre leucócitos.

Para tanto, usamos um camundongo geneticamente modificado, heterozigoto para Cx43 (Cx43^{+/-}), e infectado pos *S. mansoni*, como um modelo para caracterizar o envolvimento biológico desta proteína no desenvolvimento do granuloma nas fases aguda e crônica da doença. Estudos anteriores demonstraram que a expressão da Cx43 é reduzida em aproximadamente 50% nos animais heterozigotos Cx43^{+/-} (AVANZO et al, 2004; REAUME et al., 1995; YAMAKAGE et al., 1998).

Embora alguns trabalhos tenham demonstrado que a evolução do granuloma, induzido por *S. mansoni* em camundongos, é acompanhada de mudanças do perfil de citocinas, tamanho das lesões e nível de fibrose (DOMINGO; WARREN, 1968), em nosso estudo, a deficiência da Cx43 não determinou diferenças em relação ao tamanho ou celularidade das lesões. Cabe salientar que em nosso modelo há contínua deposição de ovos, e este fenômeno dificulta a quantificação e discriminação precisa das lesões típicas das fases aguda ou crônica.

O tamanho dos granulomas depende do seu componente celular e da matriz extracelular. Enquanto a celularidade dos granulomas é basicamente mantida pela proliferação extramedular dos macrófagos in situ (CLARK; CHEN; BOROS, 1988; LENZI et al., 1995).

Segundo Dutra et al. (1998), a celularidade da medula óssea, e as populações leucocitárias sanguíneas, não variam frente ao estímulo da infecção por *S. mansoni*. Os animais infectados com *S. mansoni* possuem ligeiro aumento de células M-CFU (unidades formadoras de colônias de macrófagos), e estas por sua vez, têm sua capacidade proliferativa aumentada nos tecidos periféricos.

Assim, o aumento da capacidade proliferativa dos macrófagos garante a manutenção da resposta granulomatosa, sem drásticas alterações da celularidade da medula óssea. Sabe-se também que as células constituintes do granuloma proliferam *in situ* em resposta ao estímulo por GM-CSF (Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos).

Dutra et al. (1998) relataram que o aumento da capacidade proliferativa das células M-CFU nos animais infectados com *S. mansoni* depende das células estromais da medula óssea. Por meio de experimentos de adoção de células, os autores demonstraram que células progenitoras, de animais infectados, quando implantadas na medula óssea de animais não infectados, não apresentam aumento da capacidade proliferativa das células M-CFU.

Corroborando com os trabalhos que apontam ausência de produção sistêmica de leucócitos pela medula óssea (CLARK; CHEN; BOROS, 1988; LENZI et al., 1995) na esquistossomose murina, a contagem das células sangüíneas e de populações linfocitárias obtida em nosso trabalho ficou inalterada. Entretanto, observamos intensa proliferação extramedular nos granulomas hepáticos, detectada por imunoistoquímica para PCNA.

As células estromais da medula óssea proporcionam o aumento da capacidade proliferativa das células M-CFU nos animais infectados com *S. mansoni*. Embora o mecanismo exato deste fenômeno seja desconhecido, ele provavelmente envolve alterações no

microambiente medular em resposta à infecção por S. mansoni.

A Cx43, por sua vez, é amplamente distribuída entre as células estromais da medula óssea, e a comunicação intercelular entre elas determina microambientes que potencialmente dirigiriam a diferenciação das células progenitoras (ALVES; CAMPOS-DE-CARVALHO; SAVINO, 1998). A expressão gênica da Cx43, na medula óssea, também está associada a eventos que demandam intensa proliferação (MONTECINO-RODRIGUEZ; LEATHERS; DORSHKIND, 2000; ROSENDAAL et al., 1994).

Animais deficientes em Cx43 têm menor da celularidade da medula e na diferenciação de linfócitos na vida neonatal, apresentando defeitos quando adultos apenas no repovoamento dos leucócitos e células vermelhas após tratamento citotóxico (MONTECINO-RODRIGUEZ; LEATHERS; DORSHKIND, 2000). Rosendaal e Stone (2003) demonstraram que o comprometimento na hematopoiese e linfopoise dos animais $Cx43^{+/-}$ é revertido quando células progenitoras $Cx43^{+/-}$ são implantadas em animais receptores $Cx43^{+/+}$ que tiveram as células estromais da medula óssea e do timo preservadas.

Dessa forma, poderíamos propor que defeitos nas células estromais da medula óssea, nos animais Cx43^{+/-}, tenham contribuído no menor índice de proliferação das células dos granulomas obtido. Assim, as células M-CFU dos granulomas, dos camundongos Cx43^{+/-}, poderiam apresentar menor capacidade proliferativa em relação aos selvagens Cx43^{+/+}. O prejuízo na comunicação intercelular também poderia determinar menor resposta ao estímulo proliferativo ao GM-CSF.

Outro fator que poderia implicar no menor índice de proliferação das células dos granulomas de animais $Cx43^{+/-}$, seria a própria atuação desta conexina no controle do ciclo celular normal. Durante todo o ciclo celular, mudanças transitórias na comunicação mediada

pelas junções do tipo *gap*, são encontradas e, provavelmente, são reguladas por cascatas de sinalização (SOLAN et al., 2003). Junções do tipo *gap* têm sido descritas como responsáveis pelo crescimento celular coordenado, agindo negativa ou positivamente para atingir uma taxa normal de crescimento (DAGLI et al., 2004).

Como já mencionado, os animais Cx43^{+/-} apresentam menor proliferação celular, embora tenham celularidade e tamanho das lesões similares em relação aos animais Cx43^{+/+}, Embora não tenhamos quantificado os índices de apoptose nos granulomas, podemos hipotetizar que estes índices estejam diminuídos nos camundongos Cx43^{+/-}. Nesse sentido, Krutovskikh, Piccoli e Yamasaki (2002) mostraram que ondas de Ca²⁺ podem se difundir por meio de canais juncionais e sinalizar morte celular. Dessa forma, animais Cx43^{+/-} poderiam ser mais refratários ao sinal de apoptose.

No entanto, o papel das junções gap no controle da morte celular ainda é controverso.

A difusão do sinal de morte celular ou a dissipação deste, pode ter efeito negativo ou positivo na sobrevivência das células. Em astrócitos, a morte celular por estresse oxidativo é prevenida pela comunicação juncional (BLANC; BRUCE-KELLER; MATTSON, 1998). Além do mais, as conexinas são ativas na sobrevivência celular à injúria, independentemente da formação ou função do canal de junção *gap* (LIN J. et al., 2003).

Nos estudos de carcinogênese a expressão de conexinas é normalmente inversamente proporcional à proliferação celular. Nesse sentido, Avanzo (2005) demonstrou que a Cx43 tem uma função supressora da carcinogênese pulmonar, inibindo o crescimento das células neoplásicas. Contudo, este fenômeno parece ser dependente do tipo de conexina e do tipo celular no qual ela é expressa. Mesnil et al. (1995) mostrou que células HeLa transfectadas com Cx26 apresentam diminuição da proliferação celular, mas o mesmo não se observa com a

transfecção de Cx43 ou Cx40.

Não obstante a proliferação e morte celulares, muitos autores atribuem ao menor desenvolvimento de processos inflamatórios em animais, o comprometimento da migração de leucócitos para o sítio das lesões. Sabe-se que a Cx43 é expressa em células endoteliais e desempenha um papel importante na migração de leucócitos.

Como em nosso modelo experimental a produção sistêmica e migração de leucócitos para os granulomas é secundária a proliferação *in situ*, possivelmente a deficiência em Cx43 não determinou a diminuição do tamanho das lesões pela menor migração de leucócitos. O defeito da migração de leucócitos, se fosse determinante, seria detectado nas fases iniciais da doença. Entretanto, os dados morfométricos dos granulomas formados após 6 semanas de infecção também não mostraram diferenças entre os genótipos.

A hipótese de menor migração de leucócitos em processos inflamatórios em animais deficientes em Cx43, é baseada em achados de experimentos *in vitro*. Eugenín et al. (2003) demonstraram que monócitos tratados com TNF- α + IFN- γ aumentam a expressão de Cx43 e formam junções heterólogas ao tansmigrar de um câmara para outra em resposta ao estímulo da quimiocina MCP-1 (proteína quimioatrante de macrófagos). A barreira de células utilizada foi uma co-cultura de células endotelias provenientes de cordão umbilical e astrócitos fetais humanos, que mimetizam a barreira hematoencefálica. A capacidade de transmigração destes macrófagos foi significantemente diminuída pela presença de octanol, conhecido bloqueador de junções *gap*.

O tratamento com terapia anti-sense para Cx43 como auxiliar da cicatrização de pele foi recentemente proposto por Qiu et al. (2003). Os autores propõem que o bloqueio da expressão da Cx43 inibiria o influxo exagerado de leucócitos para a lesão, acelerando a resolução do processo.

Brandner et al. (2004) também descreveram a importância das conexinas no processo cicatricial, e relatam que a menor infiltração de leucócitos está associada com a menor expressão de Cx43.

Uma outra hipótese considera a Cx43 importante na angiogênese, que também repercutiria no processo de migração de leucócitos. Assim, Rodriguez (2005) relatou que animais deficientes em Cx43 apresentam significante comprometimento da neovascularização experimental da córnea, com menor crescimento das células endoteliais.

Como dito anteriormente, a manutenção do granuloma depende predominantemente da proliferação extramedular de fagócitos.

Embora não tenhamos observado diferenças em relação ao tamanho das lesões, encontramos diferenças estatisticamente significantes em relação à fibrose dos granulomas. Camundongos $Cx43^{+/-}$ apresentaram maiores níveis de deposição de colágeno nas fases tardias da evolução do granuloma.

Muito da morbidade e mortalidade associada a esquistossomose murina é diretamente atribuída à deposição de elementos do tecido conjuntivo nos tecidos afetados (WYNN et al., 2004). No figado, a fibrose pode comprometer o fluxo sangüíneo e aumentar a pressão periportal. Citocinas tipo-2, notadamente IL-10 e IL-13, são importantes no desenvolvimento da fibrose hepática em camundongos (CHIARAMONTE; DONALDSON et al., 1999; CHIARAMONTE; SCHOPF et al., 1999; JANKOVIC et al., 1999).

A origem do tecido conjuntivo do granuloma hepático ainda não está bem estabelecida. Alguns trabalhos sugerem a mobilização de células de Ito do tecido adjacente para compor o granuloma. Estas células expostas aos fatores inflamatórios e citocinas do

microambiente do granuloma, apresentariam um fenótipo de células perissinusoidais hepáticas ativas na produção de colágeno. (BOLOUKHERE; BALDO-CORREA; BOROJEVIC, 1993). Confirmando esta hipótese, relatou-se aumento de células positivas para desmina, identificadas como células de Ito, na região adjacente ao granuloma hepático murino e mobilizando-se para o interior da lesão (LAZOU et al., 1993).

O aumento da fibrose em camundongos deficientes em Cx43 foi recentemente relatado por Kwak et al. (2003) que encontraram menor desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, e aumento da cápsula fibrosa nestes animais.

Embora os animais $Cx43^{+/-}$ tenham apresentado maiores níveis de fibrose, não encontramos nenhuma diferença em termos de morbidade, como perda de peso, ou mortalidade entre os camundongos de ambos genótipos.

Os granulomas desenvolvidos pelos camundongos $Cx43^{+/+}$ são exuberantes, com maior quantidade de células em proliferação e menor deposição de elementos do tecido conjuntivo em comparação aos animais $Cx43^{+/-}$. Este fato pode ser resultado de um microambiente ideal, possivelmente mantido por uma rede de comunicação formada pelas junções do tipo *gap*, que contribuiria na estabilização da homeostase do cálcio, dissipando o estresse oxidativo e prevenindo a morte celular.

Uma outra parte deste estudo foi dedicada à detecção da Cx43 nos granulomas. Neste trabalho, detectou-se pela primeira vez a expressão da Cx43 nos granulomas hepáticos e, como esperado, verificamos que a expressão gênica da Cx43 foi reduzida em aproximadamente 50%, nos granulomas provenientes de camundongos Cx43^{+/-}.

Células do granuloma expressam a proteína Cx43 nas formas citoplasmática e membranar, possivelmente formando placas juncionais. Os granulomas de camundongos $Cx43^{+/-}$ apresentaram menor nível de expressão da proteína Cx43 e reduzida densidade de

placas juncionais. Além disso, a capacidade da comunicação intercelular (GJIC) das células do granulomas de camundongos Cx43^{+/-} foi ligeiramente menor em comparação aos granulomas de animais Cx43^{+/+}. No entanto, a técnica de transferência de fluorocromo (*cut-end*) empregada não é sensível como a microinjeção ou FRAP (esgotamento de fluorescência e capacidade de retomar a fluorescência). Estas duas últimas técnicas são consideradas as mais precisas para medir a capacidade de acoplamento célula-célula (FRENDO et al., 2003; OGAWA et al., 2004; TROSKO et al., 2000).

Por fim, para estudarmos possíveis alterações funcionais dos leucócitos dos camundongos Cx43^{+/-}, elegemos o período correspondente ao pico da resposta inflamatória contra *S. mansoni*, ou seja, 8 semanas após a infecção. Analisamos então, algumas funções relevantes do funcionamento da resposta inflamatória como: fagocitose e *burst* oxidativo de monócitos e neutrófilos, bem como produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais.

Nossos resultados *in vitro* sugerem que os monócitos e neutrófilos dos animais $Cx43^{+/-}$ que desenvolveram as lesões granulomatosas apresentaram maior *burst* oxidativo em relação aqueles que foram infectados e não desenvolveram as lesões e também em relação aos camundongos $Cx43^{+/+}$.

Da mesma forma que as células estromais da medula óssea, ou o seu microambiente formado, determinam a capacidade proliferativa das células M-CFU nos animais infectados com *S. mansoni* (DUTRA et al.,1998), poderíamos supor que o mesmo possa acontecer em relação ao padrão de *burst* oxidativo dos leucócitos circulantes e também aqueles que já migraram para o sítio da lesão.

Como dito anteriormente, a Cx43 é a principal responsável pela manutenção da rede

de comunicação formada pelas junções *gap* entre as células estromais da medula óssea. Este microambiente pode determinar tanto o aumento, a diminuição ou a manutenção de um fenômeno. Assim sendo, a deleção de um alelo da Cx43 pode ter perturbado o padrão normal de *burst* oxidativo dos leucócitos, e ocasionar um aumento da respiração oxidativa detectada *in vitro* após a indução por PMA.

O maior potencial de resposta dos monócitos e neutrófilos também pode ter influenciado o desenvolvimento do granuloma. Assim, o padrão de granuloma mais fibrótico e com menor proliferação celular observado nos animais Cx43^{+/-} com 12 semanas de infecção, poderia ser reflexo de uma resposta mais efetiva e precoce que resultou na maior maturação dos granulomas destes animais.

Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que as células do granuloma estão conectadas via junções *gap* formadas por Cx43. E que as junções *gap*, ou mesmo a expressão da proteína, podem ser importantes na formação do granuloma e manutenção da homeostase do tecido granulomatoso.

Nossos resultados somados aos de outros autores, sugerem ainda que a terapia antisense ou os fármacos com ação bloqueadora de junções *gap* podem ter aplicação terapêutica importante em processos patológicos associados à inflamação agressiva e injuriante.

7 CONCLUSÕES

- a. Não houve diferenças em relação ao número e tamanho dos granulomas nos animais $Cx43^{+/+}$ e $Cx43^{+/-}$.
- b. Os granulomas de animais apresentaram maiores níveis de deposição de colágeno e menor proliferação celular na fase crônica da doença.
- c. A expressão da Cx43 foi detectada nos granulomas hepáticos de animais de ambos genótipos. Os camundongos Cx43^{+/-} apresentaram expressão gênica reduzida em, aproximadamente 50%.
- d. A proteína Cx43 foi detectada no granuloma nas formas citoplasmática e membranar, com reduzida densidade de marcação nos animais Cx43^{+/-}.
- e. Os monócitos e neutrófilos periféricos dos animais Cx43^{+/-}apresentaram aumento do *burst* oxidativo em relação aos animais selvagens.

7.1 CONCLUSÃO GERAL

A conexina 43 ou as junções comunicantes podem modular o desenvolvimento do granuloma induzido por *S.mansoni*, pois a deficiência de apenas 1 alelo de Gja1, associado à redução da expressão desta conexina, determina alterações nos mesmos.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ-SILVA, M.; DA SILVA, L. C. F.; BOROJEVIC, R. Cell membrane-associated proteoglycans mediate extramedullar myeloid proliferation in granulomatous inflammatory reactions to schistosome eggs. **Journal of Cell Science**, v. 104, p. 477-484, 1993.

ALVES, L. A.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C.; LIMA, E. O. C.; SOUZA, C. M. R.; DARDENNE, M.; SPRAY, D. C.; SAVINO, W. Functional gap junctions in thymic epithelial cells are formed by connexin 43. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 431-437, 1995.

ALVES, L. A.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C.; SAVINO, W. Gap junctions: a novel route for direct cell-cell communciation in the immune system? **Immunology Today**, v. 19, n. 6, p. 269-275, 1998.

ALVES, L. A.; COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P. M.; SPRAY, D. C.; SAVINO, W.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C. Are there functional gap junctions or junctional hemichnnels in macrophages? **Blood**, v. 88, n. 1, p. 328-334, 1996.

ALVES, L. A.; NIHEI, O. K.; FONSECA P. C.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C., SAVINO, W. Gap junction modulation by extracellular signaling molecules: the thymus model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 4, p. 457-465, 2000.

ANDRADE, G. B.; MONTES, G. S.; CONCEIÇÃO, G. M. S.; SALDIVA, P. H. N. Use of the picrosirius-polarization method to age fibrotic lesions in the hepatic granulomas produced in experimental murine schistosomiasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 265-272, 1999.

AVANZO, J. L. Carcinogênese pulmonar em camundongos portadores de deleção de um dos alelos do gene da Cx43. 2005. 303 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

AVANZO, J. L.; MESNIL, M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MACKOWIAK, I. I.; MORI, C. M. C.; DA SILVA, T. C.; OLORIS, S. C. S.; GÁRATE, A. P.; MASSIRONI, S. M. G.; YAMASAKI, H.; DAGLI, M. L. Z. Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin 43. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 10, p. 1973-7982, 2004. BERGOFFEN, J.; SCHERER, S. S.; WANG, S.; ORONZI-SCOTT, M.; BONE, L.; PAUL, D. L.; CHEN, K.; LENSCH, M. W.; CHANCE, P.; FISCHBECK, K. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie Tooth disease. **Science**, v. 262, n. 5142, p. 2039-2042, 1993.

BERTHOUD, V. M.; SAEZ, J. C. Changes in connexin 43, the gap junction protein of astrocytes, during development of the rat pineal gland. **Journal of Pineal Research**, v. 14, n. 2, p. 67-72, 1993.

BEYER, E. C.; GEMEL, J.; SEUL, K. H.; LARSON, D. M.; BANACH, K.; BRINK, P. R. Modulation of intercellular communication by differential regulation and heteromeric mixing of co-expressed connexins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 391-398, 2000.

BEYER, E. C.; STEINBERG, T. H. Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 166, n. 13, p. 7971-7974, 1991.

BITTMAN, K. S.; LOTURCO, J. J. Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. **Cerebral Cortex**, v. 9, p. 188-195, 1999.

BLANC, E. M.; BRUCE-KELLER, A. J.; MATTSON, M. P. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death. **The Journal of Neurochemistry**, v. 70, p. 958-970, 1998.

BOLOUKHERE, M.; BALDO-CORREA, E.; BOROJEVIC, R. Experimental schistosomiasis mansoni: characterization of connective tissue cells in hepatic periovular granulomas. **Journal of Submicroscopy Cytology Pathology**, v. 25, n. 4, p. 505-517, 1993.

BOROS, D. L. Granulomatous inflammation. Progress in Allergy, v. 24, p. 183-267, 1978.

BRAET, K.; ASPESLAGH, S.; VANDAMME, W.; WILLECKE, K.; MARTIN, P. E. M.; EVANS, W. H.; LAYBAERT, L. Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-triphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells. Journal of Cell Physiology, v. 197, n. 2, p. 205-213, 2003.

BRANDNER, J. M.; HOUDEK, P.; HÜSING, B.; KAISER, C.; MOLL, I. Connexins 26, 30 and 43: differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 1310-1320, 2004.

BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; PAUL, D. L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. **European Journal of Biochemistry**, v. 238, p. 1-27, 1996.

BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; PAUL, D. L. Expression of chimeric connexins reveals new properties of the formation and gating behavior of gap junction channels. **Current Opinion in Structure Biology**, v. 6, p. 183-192, 1996.

CANCELAS, J. A.; KOEVOET, W. L. M.; KONING, A. E.; MAYEN, A. E. M.; ROMBOUTS, E. J. C.; PLOEMACHER, R. E. Connexin-43 gap junctions are involved in multiconnexin-expressing stromal support of hemopoietic progenitors and stem cells. **Blood**, v. 96, n. 2, p. 498-505, 2000.

CHIARAMONTE, M. G.; DONALDSON, D. D.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 6, p. 777-785, 1999.

CHIARAMONTE, M. G.; SCHOPF, L. R.; NEBEN, T. Y.; CHEEVER, A. W.; DONALDSON, D. D.; WYNN, T. A. IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cellmediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by Schistosoma mansoni eggs. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 920-930, 1999.

CHURCHILL D.; CAVENEY, S. Double whole-cell patch-clamp characterization of gap junction channels in isolated insect epidermal cell pairs. **Journal Membrane Biology**, v. 135, n. 2, p. 165-180, 1993.

CLARK, C. R.; CHEN, B. D. M.; BOROS, D. L. Macrophage progenitor cell and colonystimulating factor production during granulomatous schistosomiasis mansoni in mice. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 2680-2685, 1988.

COKER, C. M.; LICHTENBERG, F. A revised method for isolation of Schistosoma mansoni eggs for biological experimentation. **Proceedings in Society of Experimental Biology Medicine**., v. 92, n. 4, p. 780-782, 1956.

CONTRERAS, J. E.; SÁEZ, J. C.; BUKAUSKAS, F. F.; BENNETT, M. V. L. Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. **Proceedings in Natural Academy Science**, v. 100, n. 20, p. 11388-11393, 2003.

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 connexin 32 only in the liver. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 4, p. 483-492, 2004.

DANNENBERG, A. M.; ROOK, G. A. W. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: interplay of tissue-damaging and macrophage activating immune responses. In BLOOM, B.R. **Tuberculosis,** pathogenesis, protection and control. Washington: American Society Microbiology Press, 1994. p. 459.

DEWEY, M. M.; BARR, L. Intercellular connection between smooth muscle cells: the nexus. **Science**, v 137, p. 670-672, 1962.

DOMINGO, E. D.; WARREN, K. S. Endogenous desensitization: changing host granulomatous response to schistosome eggs at different stages of infection with schistosoma mansoni. **American Journal of Pathology**, v. 52, n. 2, p. 369-379, 1968.

DORSHKIND, K; GREEN, L.; GODWIN, A.; FLETCHER, W. H. Connexin-43-type gap junctions mediate communication between bone marrow stromal cells. **Blood**, v. 82, n. 1, p. 38-45, 1993.

DUMONT, A. E.; BECKER, F. F.; WARREN, K. S.; MARTELLI A.B. Regulation of spleen growth and portal pressure in hepatic schistosomiasis. **American Journal of Pathology**, v. 78, p. 211-224, 1975.

DUTRA, H. S.; EL-CHEIKH, M. C.; AZEVEDO, S. P.; ROSSI, M. I.; BOROJEVIC, R. Murine schistosomiasis mansoni: experimental analysis of bone marrow and peripheral myelopoiesis. **Parasitology Research**, v. 84, p. 668-675, 1998.

EUGENÍN, E. A.; BRAÑES, M. C.; BERMAN, J. W.; SÁEZ, J. C. TNF-α plus IFN-γ induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 1320-1328, 2003.

FALLON, P. G.; DUNNE, D. W. Tolerization of mice to Schistosoma mansoni egg antigens causes elevated type 1 and diminished type 2 cytokine response and increased mortality in acute infection . **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 4122-4132, 1999.

FALLON, R. F.; GOODENOUGH, D. A. Five hours half-life of mouse liver gap junction. **Journal of Cell Biology**, v. 90, p. 521-526, 1981.

FONSECA, P. C.; NIHEI, O. K.; URBAN-MALDONADO M.; ABREU, S.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C.; SPRAY, D. C.; SAVINO, W.; ALVES, L. A. Characterization of connexin 30.3 and 43 in thymocytes. **Immunology Letters**, v. 94, p. 65-75, 2004.

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

GIEPMANS, B. N. Gap junctions and connexin-interacting proteins. Cardiovascular Research, v. 26, n. 8, p. 870-881, 2004.

GIEPMANS, B. N.; VERLAAN, I.; MOOLENAAR, W. H. Connexin-43 interactions with ZO-1 and alpha and beta-tubulin. **Cell Communication and Adhesion**, v. 8, p. 219-223, 2001.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal Immunology Methods**, v.117, p.53-58, 1989.

HATZ, C. F. The use of ultrasound in schistosomiasis. Advances in Parasitology, v. 48, p. 225-284, 2001.

HEAD, G. M.; MENTLEIN, R.; KRANZ, A.; DOWNING, J. E. G.; KENDALL, M. D. Modulation of dye-coupling and proliferation in cultured rat thymic epithelium by factors involved in thymulin secretion. **Journal of Anatomy**, v. 191, p. 355-365, 1997.

HERNADEZ-BLAZQUEZ, F. J.; JOAZEIRO, P. P.; OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Control of intracellular movement of connexins by E-cadherin in murine papiloma cells. **Experimental Cell Research**, v. 270, p. 235-247, 2001.

HESSE, M.; MODOLELL, M.; LA FLAMME, A. C.; SCHITO, M.; FUENTES, J. M.; CHEEVER, A. W.; PEARCE, E. J.; WYNN, T. A. Differential regulations of nitric oxide synthase-2 and arginase -1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 6533-6544, 2001.

HESSE, M.; PICCIRILLO, C. A.; BELKAID, Y.; PRUFER, J.; MENTINK-KANE, M.; LEUSINK, M.; CHEEVER, A. W.; SHEVACH, E. M.; WYNN, T. A. The pathogenesis of Schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 3157-3166, 2004
HOUGHTON, F. D.; THONNISSEN, E.; KIDDER, G. M.; NAUSS, C. C.; WILLECKE, K.; WINTERHAGER, E. Doubly mutant mce, deficient in connexin 32 and 43, show normal prenatal development of organs where two gap junction proteins are expressed in the same cells. **Developmental genetics**, v. 24, n. 1-2, p. 5-12, 1999.

HULSER, D. F.; PETERS, J. H. Contact cooperation in stimulated lymphocytes. II. Electrophysiological investigations on intercellular communication. **Experimental Cell Research**, v. 74, p. 319-326, 1972.

IHARA, A.; MURAMATSU, T.; SHIMONO, M. Expressin os connexin 32 and 43 in developing rat submandibular salivary glands. **Archives of Oral Biology**, v. 45, p. 227-235, 2000.

JAGIRDAR, J.; ZAGZAG, D. Pathology and insights into pathogenesis of tuberculosis. In: ROM, W.N.; GARAY, S. **Tuberculosis**. Boston: Little Brown, 1996. p. 467.

JAKUBZICK, C.; KUNKEL, S. L.; JOSHI, B. H.; PURI, R. K.; HOGABOAM, C. M. Interleukin-13 fusion cytotoxin arrests Schistosoma mansoni egg-induced pulmonary granuloma formation in mice. **American Journal of Pathology**, v. 161, n. 4, p. 1283-1297, 2002.

JANKOVIC, D.; KULLBERG, M. C.; NOBEN-TRAUTH, N.; CASPAR, P.; WARD, J. M.; CHEEVER, A. W.; PAUL, W. E.; SHER, A. Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 337-342, 1999.

JARA, P. I.; BORIC, M. P.; SÁEZ, J. C. Leukocytes express connexin 43 after activation with lipopolysacharide and appear to form gap junctions with endotelial cells after ischemia-reperfusion. **Proceedings in Natural Academy Science**, v. 96, p. 7011-7015, 1995.

JONGEN, W. M. F.; FITZGERAL, D. J.; ASAMOTO, M.; PICCOLI, C.; SLAGA, J. T.; GROS, D.; TAKEICHI, M.; YAMASAKI, H. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. **Journal of Cell Biology**, v.114, p. 545-555, 1991.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.

KANEMITSU, M. Y.; JIANG, W.; ECKHART, W. Cdc-2-mediated phosphorilation of the gap junction protein, connexin 43, during mitosis. **Cell Growth & Differentiation**, v. 9, p. 13-21, 1998.

KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annual review Immunology**, v. 11, p. 129-163, 1993.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v. 14, p. 629-640, 1997.

KELSELL, D. P.; DUNLOP, J.; STEVENS, H. P.; LENCH, N. J.; LIANG, J. N.; PARRY, G.; MUELLER, R. F.; LEIGH, I. M. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. **Nature**, v. 387, p. 80-83, 1997.

KRENÁCS, T.; ROSENDAAL, M. Connexin43 gap junctions in normal, regenerating, and cultured mouse bone marrow and in human leukemias. **American Journal of Pathology**, v. 152, n. 4, p. 993-1004, 1998.

KRENÁCS, T.; ROSENDAAL, M. Immunohistological detection of gap junctions in human lymphoid tissue: connexin 43 in follicular dendritic and lymphoendothelial cells. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1125-1137, 1995.

KRENÁCS, T.; VAN DARTEL, M.; LINDHOUT, E.; ROSENDAAL, M. Direct cell/cell communication in the lymphoid germinal center: connexin 43 gap junctions functionally couple follicular dendritic cells to each other and to B lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v. 27, p. 1489-1497, 1997.

KRUTOVSKIKIH, V. A.; PICCOLI, C; YAMASAKI, H. Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. **Oncogene**, v. 21, n. 13, p. 1989-1999, 2002.

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

KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. The *gap* junction communication channel. Cell, v. 84, p. 381-386, 1996.

KWAK, B. R; MULHAUPT, F.; VEILLARD, N.; GROS, D. B.; MACH, F. Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v. 22, p. 225- 230, 2002.

KWAK, B. R.; VEILLARD, N.; PELLI, G.; MULHAUPT, F.; JAMES, R. W.; CHANSON, M.; MACH, F. Reduced Connexin43 expression inhibits atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 1007, p. 1033-1039, 2003.

LAIRD, D. W.; PURANAM, K. L.; REVEL, J. P. Turnover and phosphorilation dynamics of connexin 43 gap junction protein in cultures cardiac myocytes. **Biochemical Journal**, v. 273, p. 67-72, 1991.

LAMPE, P. D.; KURATA, W. E.; WARN-CRAMER, B.; LAU, A. F. Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p 34^{cdc2} kinase. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 833-841, 1998a.

LAZOU, J. M.; ZAMPETTI-BOSSELER, F.; GEERTS, A., BOROJEVIC, R. WISSE, E. Tissue distribution of desmin-positive cells in mouse liver during Schistosoma mansoni infection. In: KNOOK, D.L.; WISSE, E. Cells of the hepatic sinusoid. Leiden: The Kuffer Cell Foundation, 1993.

LEETHANAKUL, C.; PATEL, V.; GILLESPIE, J.; SHILLITOE, E.; KELLMAN, R. M.; ENSLEY, J. F.; LIMWONGSE, V.; EMMERT-BUCK, M. R.; KRZMAN, D. B.; GUTIND, J. S. Gene expression profiles in squamous cell carcinomas of the oral cavity: use of laser capture microdissection for the construction and analysis of stage-specific cDNA libraries. **Oral Oncology**, v. 36, p. 474-483, 2000.

LENZI, H. L.; LENZI, J. A.; ROSMAN, F. C.; PELAJO-MACHADO, M.; MOTA, E. M.; PENASCO, M. S.; OLIVEIRA, D. N. Extramedullary hematopoiesis in murine schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 169-177, 1995.

LERNER, D. L.; YAMADA, K. A.; SCHUESSLER, R. B.; SAFFITZ, J. E. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. **Circulation**, v. 8, p. 547-552, 2000.

LEVY, J. A.; WEISS, R. M.; DIRKSEN, E. R.; ROSEN, M. R. Possible communication between murine macrophages oriented in linear chains in tissue culture. **Experimental Cell Research**, v. 103, p. 375-385, 1976.

LIN, R.; WARN-CRAMER, B. J.; KURATA, W. E.; LAU, A. F. v-Src phosphorilation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. Journal of Cell Biology, v. 154, p. 815-827, 2001.

LIN, J. H. C.; YANG, J.; LIU, S.; TAKANO, T.; WANG, X.; GAO, Q.; WILLECKE, K.; NEDERGAARD, M. Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 2, p. 430-441, 2003.

LIVAK, K. J.; FLOOD, S. J.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotide probe with ;fluorescent dyes at oppasite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Appl.**, v. 2, p. 357-362, 1995.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2 (-delta delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MAGA, G.; HÜBSCHER, U. Proliferanting cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 3051-3060, 2003.

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

MARTIN, C. A.; EL-SABBAN, M. E.; ZHAO, L.; BURAKOFF, R.; HOMAIDAN, F. R. Adhesion and cytosolic dye transfer between macrophages and intestinal epithelial cells. **Cell Adhesion and Communication**, v. 5, n. 2, p. 83-95, 1998.

MASSOCO, C. O. **Efeitos do Diazepan sobre a atividade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c**. 1998, 109f, Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, p. 11-19, 2003.

MEDA, P. The role of gap junction membrane channels in secretion and hormonal action, **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 28, n. 4, p. 369-377, 1996.

MEDA, P.; PEPPER, M. S.; TRAUB, O.; WILLECKE, K.; GROS, D.; BEYER, E.; NICHOLSON, B.; PAUL, D.; ORCI, L. Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. **Endocrinology**, v. 133, n. 5, p. 2371-2378, 1993.

MELRO, M. C. B. F.; MARIANO, M. Extra-Tissular Schistosoma mansoni egg granulomata in the peritoneal cavity of mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, suplemento 4, p. 245-252, 1987.

MESNIL, M.; KRUTOVSKIKH, V.; PICCOLI, C.; ELFGANG, C.; TRAUB, O.; WILLECKE, K.; YAMASAKI, H. Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. **Cancer Research**, v. 55, p. 629-639, 1995.

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

MOORBY, C. D. A connexin 43 mutant lacking the carboxyl cytoplasmic domain inhibits both growth and motility of mouse 3T3 fibroblasts. **Molecular Carcinogenesis**, v. 28, p. 23-30, 2000.

MUNARI-SILEM, Y.; ROUSSET, B. Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands – molecular and functional aspects: a review. **European Journal of Endocrinology**, v. 135, p. 251-264, 1996.

NAVAB, M.; LIAO, F.; HOUGH, G. P.; ROSS, L. A.; LENTEN, B. J. V.; RAJAVASHISTH, T. B.; LUSIS, A. J.; LAKS, H.; DRINKWATER, D. C.; FOGELMAN, A. M. Interaction of monocytes with cocultures of human aortic wall cells involves interleukins 1 and 6 with marked increases in connexin43 message. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, p. 1763-1772, 1991.

NICHOLSON, B. J.; WEBER, P. A.; CAO, F.; CHANG, H. C.; LAMPE, P.; GOLDBERG, G. The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 369-378, 2000.

O'DONNELL, P.; GRACE, A. A. Cortical afferents modulate striatal gap junction permeability via nitric oxide. **Neuroscience**, v. 76, n. 1, p. 1-5, 1996.

OGAWA, T.; HAYASHI, T.; KYOIZUMI, S.; KUSUNOKI, Y.; NAKACHI, K.; MACPHEE, D. G.; TROSKO, J. E.; KATAOKA, K.; YORIOKA, N. Nisomycin dowregulates gap-junctional intercellular communication via the p38 MAP-kinase pathway. Journal of Cell Science, v. 117, p. 2087-2096, 2004.

OLIVEIRA-CASTRO, G. M.; BARCINSKI, M. A. Calcium-induced uncoupling in communicating human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 352, p. 338-343, 1974.

OLIVEIRA-CASTRO, G. M.; BARCINSKI, M. A.; CUKIERMAN, S. Intracellular communication in stimulated human lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 111, p. 1616-1619, 1973.

OLIVEIRA-CASTRO, G. M.; DOS REIS, G. A. Electrophysiology of phagocytic membranes. III. Evidence for a calcium-dependent postassium permeability change during slow hyperpolarizations of activates macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 640, p. 500-511, 1981.

OVIEDO-ORTA, E.; EVANS, W. H. Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1662, p. 102-112, 2004.

OVIEDO-ORTA, E.; GASQUE, P.; EVANS, W. H. Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. **FASEB Journal**, v. 15, p. 768-774, 2001.

OVIEDO-ORTA, E.;HOY, T.; EVANS, W. H. Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations. **The Journal of Immunology**, v. 99, p. 578-590, 2000.

PELLEGRINO, J.; BRENER, Z. Method for isolating schistosome granulomas from mouse livers. **Journal of Parasitology**, v. 42, p. 564, 1956.

PFEIFER, 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, n. 15, p. 4550-4562, 2004.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxid and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunology Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunology Methods**, v. 38, p. 161-170, 1980.

POLACEK, D.; BECH, F.; MCKINSEY, J. F.; DAVIES, P. F. Connexin 43 gene expression in the rabbit arterial wall: effects of hypercholesterolemia, balloon injury and their combination. **Journal of Vascular Research**, v. 34, p. 19-30, 1997.

QIU, C.; COUTINHO, P.; FRANK, S.; FRANKE, S.; LAW, L.; MARTIN, P.; GREEN, C. R.; BECKER, D. L. Targeting connexin43 expression accelerates the rate of wound repair. **Current biology**, v. 13, p. 1697-1703, 2003.

REAUME, A. G.; DE SOUSA, P. A.; KULKARNI, S.; LANGILLE, B. L.; ZHU, D.; DAVIES, T. C.; JUNEJA, S. C.; KIDDER, G. M.; ROSSANT, J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin 43. **Science**, v. 267, p. 1831-1834, 1995

REVEL, J. P.; KARNOVSKY, M. J. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. Journal of Cell Biology, v. 33, p. C7-C12, 1967.

RICHARD, G.; SMITH, L. E.; BAILEY, R. A.; ITIN, P.; HOHL, D.; EPSTEIN, E. H.; DIGIOVANNA, J. J.; COMPTON, J. G.; BALE, S. J. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratodermia variabilis. **Nature Genetics**, v. 20, p. 366-369, 1998b.

RICHARD, G.; WHITE, T. W.; SMITH, L. E.; BAILEY, R. A.; COMPTON, J. G.; PAUL, D. L.; BALE, S. J. Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. **Human Genetics**, v. 103, p. 393-399, 1998a.

ROSENDAAL, M. Gap junctions in blood forming tissues. Microscopy Resarch and Technique, v. 31, p. 396-407, 1995.

ROSENDAAL, M.; GREEN, C. R.; RAHMAN, A.; MORGAN, D. Up-regulation of the connexin 43+ gap junction network im haematopoietic tissue before the growth of stem cells. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 29-37, 1994.

ROSENDAAL, M.; STONE, M. Enhancement of repopulation haemopoiesis by heterozygous connexin 43 stem cells seeded on wild-type connexin 43 stroma. **Clinical Science**, v. 105, p. 561-568, 2003

ROZENTAL, R.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C.; SPRAY, D. C. Gap junctions in the cardiovascular and immune systems. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 4, p. 365-368, 2000.

RUSSO, M.; TEIXEIRA, H. C.; MARCONDES, M. C. G.; BARBUTO, J. A. M. Superoxideindependent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n. 10, p. 1271-1273, 1989. RODRIGUEZ, L. C. S. Avaliação do papel da conexina 43 na angiogênese, experimentalmente induzida em córnea de camundongos. 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SÁEZ, J. C.; BERTHOUD, V. M.; MORENO, A. P.; SPRAY, D. C. Gap junctions: multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications. In: SHENOLIKAR S., NAIRN A.C. Advance in Second Messenger Phosphoprotein Research. New York: Raven Press, 1993. p. 163-198.

SÁEZ, J. C.; BRANES, M. C.; CORVALAN, L. A.; EUGENIN, E. A.; GONZALEZ, H. E.; MARTINEZ, A. D.; PALISSON, F. Gap junctions in cells of the immune system: structure, regulation and possible functional roles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 447-455, 2000.

SÁEZ, J. C.; MARTÍNEZ, A. D.; BRANES, M. C.; GONZALEZ, H. E. Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 593-600, 1998.

SAFFITZ, J. E. Regulation of intercellular coupling in acute and chronic heart disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 4, p. 407-414, 2000.

SAI, K.; KANNO, J.; HASEGAWA, R.; TROSKO, J. E.; INOUE, T. Prevention of the downregulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 9, p. 1671-1676, 2000.

SAVINO, W.; DARDENE, M. Neuroendocrine control of thymus physiology. **Endocrinology Reviews**, v. 21, p. 412-443, 2000.

SCHANDENE, L.; ALONSO-VEGA, C.; WILLEMS, F.; GERARD, C.; DELVAUX, A.; VELU, T.; DEVOS, R.; DE BOER, M.; GOLDMAN, M. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by Il-10. **The Journal of Immunol**, v. 152, p. 4368-4374, 1994.

SEGRETAIN, D.; FIORINI, C.; DECROY, X.; DEFAMIE, N.; PRAT, J. R.; POINTIS, G. A proposed role for ZO-1 in targeting connexin 43 gap junction to the endocytic pathway. **Biochimie**, v. 86, p. 241-244, 2004.

SHIELS, A.; MACKAY, D.; IONIDES, A.; BERRY, V.; MOORE, A.; BHATTACHARYA, S. A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal

dominante "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q. American Journal of Human Genetics, v. 62, p. 526-532, 1998.

SINGH, D.; LAMPE, P. D. Identification of connexin-43 interacting proteins. Cell Communication and Adhesion, v. 10, p. 215-220, 2003.

SOLAN, J. L.; FRY, M. D.; TENBROEK, E. M.; LAMPE, P. D. Connexi43 phosphorilation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. Journal of Cell Science, v. 116, p. 2203-2211, 2003.

STEIN, L. S.; BOONSTRA, J.; BURGHARDT, R. C. Reduced cell-cell communication between mitotic and nonmitotic cells. **Experimental. Cell Research**, v. 198, p. 1-7, 1992.

TAGA, K.; MOSTOWSKI, H.; TOSATO, G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. **Blood**, v. 81, p. 2964-2971, 1993.

TODT, J. C.; WHITFIELD, J. R.; IVARD, S. R.; BOROS, D. L. Down-regulation of interleukin-12, interleukin-12R expression/activity mediates the switch from $T_{\rm H}1$ to $T_{\rm H}2$ granuloma response during murine Schistosomiasis Mansoni. Scandinavian Journal of Immunology, v.52, p. 385-392, 2000.

TORRES, L. N. **Expressão de conexinas e de E-Caderina em glândulas mamárias hiperplásicas e neoplásicas de cães**. 2002. 150 f. Disseratação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

TROSKO, J. E.; CHANG, C.; WILSON, M. R.; UPHAM, B.; HAYASHI, T.; WADE, M. Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation. **Methods**, v. 20, n. 2, p. 245-264, 2000.

TSIEN, R. W.; WEINGART, R. Inotropic effect of cyclic AMP in calf ventricular muscle studied by a cut end method. **Journal of Physiology**, v.260, n. 1, p. 117-141, 1976.

TSUKAHARA, S.; MAEKAWA, F.; TSUKAMURA, H.; HIRUNAGI, K.; MAEDA, K. Morphological characterization of relationship between gap junctions and gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the rat median eminence. **Neuroscience Letters**, v. 261, p. 105-108, 1999. UMEZAWA, A.; HATA, J. Expression og Gap-Juncitonal protein (connexin 43 or α 1 gap junction) Down-regulated at the transcriptional level during adipocyte differentiation of H-1/A marrow stromal cells. **Cell Structure and Function**, v. 17, p. 177-184, 1992.

UNGER, V. M.; KUMAR N. M.; GILULA, N. B.; YEAGER, M. Three dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. **Science**, v.283, p. 1176-1180, 1999.

UNWIN, P. N. T.; ZAMPIGHI, G. Structure of the junction between communicating cells. **Nature**, v. 283, p. 545-549, 1980.

VERSELIS, V. K.; TREXLER, E. B.; BUKAUSKAS, F. F. Connexin hemichannels and cellcell channels: comparison of properties. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 379-389, 2000.

VOSPER, H.; KHOUDOLI, G. A.; PALMER, C. N. A. The peroxisome proliferators activated receptor δ is required for the differentiation of THP-1 monocytic cells by phorbol ester. **Nuclear Receptor**, v. 1, p. 1-10, 2003.

WEINSTOCK, J. V.; ELLIOTT, D.; METWALI, A.; BLUM, A.; LI, J.; QADIR, K.; SANDOR, M. Immunoregulation within the granulomas of murine schistosomiasis mansoni. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 491-498, 1999.

WILLECKE, 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. **Journal of Biological Chemistry**., v.383, p. 725-737, 2002.

WHITE, T. W.; BRUZZONE, R.; WOLFRAN, S.; PAUL, D. L; GOODENOUGH, D. A. Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. **Journal Cell Biology**, v. 125, p. 879-892, 1994.

WHITE, T. W.; DEANS, M. R.; KELSELL, D. P.; PAUL, D. L. Connexin mutations in deafness. Nature, v. 394, p. 630-631, 1998.

WONG, C. W.; CHRISTEN, T.; KWAK, B. R. Connexins in leukocytes: shuttling messages? Cardiovascular research, v. 62, p. 357-367, 2004.

WYNN, T. A.; THOMPSON, R. W.; CHEEVER, A. W.; MENTINK-KANE, M. M. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunology Reviews**, v. 201, p. 156-167, 2004. XIA, J. H.; LIU, C. Y.; TANG, B. S.; PAN, Q.; HUANG, L.; DAÍ, H. P.; ZHANG, B. R.; XIE, W.; HU, D. X.; ZHENG, D.; SHI, X. L.; WANG, D. A.; XIA, K.; YU, K. P.; LIAO, X. D.; FENG, Y.; YANG, Y. F.; XIAO, J. Y.; XIE, D. H.; HUANG, J. Z. Mutations in the gene encoding *gap* junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. **Nature Genetics**, v. 20, p. 370-373, 1998.

XIE, H.; LAIRD, D. W.; CHANG, T. H.; HU, V. W. A mitosis-specific phosphorialtion of the gap junction protein connexin 43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization. **Journal of Cell Biology**, v. 137, p. 203-210, 1997.

YAMAKAGE, K.; OMORI, Y.; PICCOLI, C.; YAMASAKI, H. Growth control of 3T3 fibroblast cell line established from connexin 43-deficient mice. **Molecular Carcinogenesis**, v. 23, p. 121-128, 1998.

YAMASAKI, H. Cellular and molecular methods to study the role of gap junctional intercellular communication in toxicology. **Toxicology** *in vitro*, v. 11, p. 535-542, 1997.

YAMASAKI, H. *Gap* junction intercellular communication and carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 11, n. 7, p. 1051-1058, 1990.

YAMASAKI, H.; NAUS, C. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1199-1213, 1996.