LUCAS CAMPOS DE SÁ RODRIGUES

**Avaliação do papel da
conexina 43 na angiogênese,
experimentalmente induzida em córnea de
camundongos**

São Paulo
2005

LUCAS CAMPOS DE SÁ RODRIGUES

**Avaliação do papel da conexina 43 na angiogênese,
experimentalmente induzida em córnea de camundongos**

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

Departamento
Patologia

Área de concentração
Patologia Experimental e Comparada

Orientador
Prof. Dr. Idécio Luiz Sinhorini

Co-orientadora
Profa. Dra. Mara Lúcia Zaidan Dagli

São Paulo
2005

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

conf. de
2005
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'APICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
06/07/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1497 FMVZ	<p>Rodrigues, Lucas Campos de Sá</p> <p>Avaliação do papel da conexina 43 na angiogênese, experimentalmente induzida em córnea de camundongos / Lucas Campos de Sá Rodrigues. – São Paulo : L. C. S. Rodrigues, 2005. 106 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2005.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Idécio Luiz Sinhorini. Co-orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli.</p> <p>1. Conexina 43. 2. Angiogênese. 3. Córnea. 4. Camundongos. I. Título.</p>
----------------	---

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do papel da conexina 43 na angiogênese, experimentalmente induzida na córnea de camundongos", Protocolo nº322/2003, utilizando 80 camundongos, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of the role of connexin 43 experimentally induced into a rat's cornea" protocol number 322/2003, utilizing 80 mice, under the responsibility of Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini, 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 "ad referendum" meeting.

São Paulo, 17 de outubro de 2003

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: RODRIGUES, Lucas Campos de Sá

Título: Avaliação do papel da conexina 43 na angiogênese, experimentalmente induzida em córnea de camundongos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Aos meus pais, Celso e Norma pelo constante
apoio, dedicação e por confiarem em mim.

Aos meus irmãos Beatriz e Marcos.

Aos meus avós Francisco *in memoriam*,

Norma, Oswaldo e Dadá.

Aos meus tios: Júlio, Marilza, Kiko e Dim.

A todos os animais que são a razão
da minha dedicação.
E com muito respeito,
aos animais que contribuíram
doando suas vidas nesse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Idécio Luiz Sinhorini, pela receptividade, oportunidade, apoio, confiança, dedicação, paciência, otimismo, pela extrema vontade de ajudar demonstrado durante todo esse período de desenvolvimento deste trabalho.

À Profa Maria Lúcia Zaidan Dagli pela disposição em ajudar, por estar sempre pronta a qualquer necessidade, por ceder espaço para este trabalho e dar todas as condições para realiza-lo, pela competência e dedicação.

Ao José Luiz Avanzo pela amizade, grande ajuda na execução deste trabalho, pela competência pelo direcionamento e orientação.

Aos amigos Silvia, Tereza, Heyde, Patrícia, Kátia e Márcia pelos bons momentos vividos.

As técnicas Ivone Fonseca e Cíntia Esteves de Lima pela orientação e dedicação nos procedimentos realizados.

As estagiárias e amigas Sheila Oliveira de Souza e Viviane Néri, pela ajuda na execução dos experimentos, organização e preparo de todos os materiais.

A técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Shirlei Meire da Silva, pela grande disposição e vontade de fazer bem feito.

Á Claudia Madalha Cabreira Mori e toda sua equipe pelo excelente profissionalismo na manutenção do biotério.

Ás bibliotecárias da FMVZ-USP por estarem sempre a disposição, por ajudarem em tudo o que foi preciso, no auxílio na elaboração deste trabalho e sobre tudo pela dedicação e profissionalismo.

RESUMO

RODRIGUES, L. C. S. **Avaliação do papel da conexina 43 na angiogênese, experimentalmente induzida em córnea de camundongos.** [Evaluation the role of connexin 43 during angiogenesis, experimentally induced in mice cornea]. 2005. 106f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

As junções GAP são canais intercelulares responsáveis pela comunicação de células vizinhas, por onde passam pequenas moléculas e íons que mantêm a homeostasia celular. A junção GAP é formada seis proteínas, as conexinas. Na célula endotelial encontram-se as conexinas 37, 40 e 43. Nesse estudo, estimulamos a angiogênese em córnea de camundongos, através da cauterização com cristal de nitrato de prata. Foram utilizados camundongos heterozigotos para o gene da conexina 43 (Cx43^{+/-}) e camundongos selvagens (Cx43^{+/+}). As córneas foram analisadas 2 e 6 dias após a cauterização através por meio da morfologia vascular, detecção das Cx37, Cx40, Cx43, PCNA por meio de Western Blot e avaliação ultraestrutural das células endoteliais. Como resultado obtivemos uma menor área de preenchimento vascular nos animais Cx43^{+/-} em 2 e 6 dias após a lesão corneal, porém, em relação a extensão dos vasos não foi observado diferenças entre os grupos. Uma menor proliferação celular foi verificada através da detecção do PCNA, nos animais heterozigotos, somente após 2 dias da lesão corneal. Não houve alteração da Cx37 e Cx40 entres os grupos. A Cx43 parece ser uma conexina importante para a célula endotelial durante o processo de angiogênese.

Palavras Chave: Conexina 43. Angiogênese. Córnea.

Camundongos.

ABSTRACT

RODRIGUES, L. C. S. **Evaluation the role of connexin 43 during angiogenesis, experimentally induced in mice córnea.** [Avaliação do papel da conexina 43 na angiogênese, experimentalmente induzida em córnea de camundongos]. 2005. 106f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The GAP junctions are intercellular streams responsible for the communication between close cells, which allow small molecules and ions to pass through them maintaining the cellular homeostasis. The GAP junction is formed of six proteins, the connexin. In the endothelial cell, there are the connexin 37, 40 and 43. In this study, we stimulated the angiogenesis in the mice's cornea through its cauterization using silver's crystal glass. It was used heterozygote mice to the gene of connexin 43 (Cx43^{+/-}) and wild mice (Cx43^{+/+}). The corneas were analyzed 2 and 6 days after the cauterization through the vascular morphology, detection of Cx37, Cx40, Cx43, PCNA through Western Blot and ultrastructural evaluation of the endothelial cells. As a result, we obtained a smaller area of vascular fillness in the animals Cx43^{+/-} with 2 and 6 days of corneal injury, however, in regard to the extensions of the vessels, it wasn't observed any changes between the groups. A smaller proliferation of cells was verified, through the detection of PCNA, in the heterozygote animals only 2 days after the corneal injury. There wasn't any modification of the Cx37 and Cx40 between groups. The Cx43 seems to be an important connexin to the endothelial cell during the process of angiogenesis.

Key Words: Connexin 43. Angiogenesis. Cornea.

Mice.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	COMUNICAÇÃO INTERCELULAR	16
2.2	AS JUNÇÕES GAP	17
2.3	AS CONEXINAS	22
2.4	A CONEXINA 43	25
2.5	CONEXINAS NA PAREDE VASCULAR E CÉLULAS ENDOTELIAIS	26
2.6	ANGIOGÊNESE	30
2.7	ETAPAS DA NEOFORMAÇÃO VASCULAR	31
2.8	COMUNICAÇÃO ENTRE CÉLULAS ENDOTELIAIS	33
2.9	MODELOS DE ESTUDO DE VASOS NEOFORMADOS	35
2.10	CAUTERIZAÇÃO CORNEAL COM CRISTAL DE NITRATO D PRATA	36
2.11	ESTRUTURA HISTOLÓGICA DA CÓRNEA	37
2.12	INVASÃO VASCULAR NA CÓRNEA	39
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	ANIMAIS	45
4.2	CERTIFICADO DE BIOSSEGURANÇA E NORMAS PARA A MANUTENÇÃO E TRABALHOS EM CONTENÇÃO COM ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS	46
4.3	GENOTIPAGEM	47
4.4	CAUTERIZAÇÃO CORNEAL	48
4.4.1	Anestesia	49
4.4.2	Cauterização	49
4.4.3	Analgesia	49
4.5	COLHEITA DO MATERIAL PARA ANÁLISE DA MORFOLOGIA VASCULAR	50
4.6	COLHEITA DO MATERIAL PARA WESTERN BLOT E	

ULTRAESTRUTURA.....	51
4.7 MORFOMETRIA DOS VASOS NEOFORMADOS.....	51
4.8 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	52
4.9 DETECÇÃO DAS Cx 37, Cx40, Cx43 e PCNA POR MEIO DE WESTERN BLOT.....	53
4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	54
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5 RESULTADOS.....	56
5.1 MORFOLOGIA E QUANTIFICAÇÃO VASCULAR APÓS 2 DIAS DA CAUTERIZAÇÃO CORNEAL.....	56
5.2 MORFOLOGIA E QUANTIFICAÇÃO VASCULAR APÓS 6 DIAS DA CAUTERIZAÇÃO CORNEAL.....	64
5.3 IMUNOMARCAÇÃO DA CONEXINA 43 POR WESTERN BLOT.....	75
5.4 IMUNOMARCAÇÃO DO PCNA POR WESTERN BLOT EM Córnea APÓS 2 DIAS DA LESÃO.....	76
5.5 IMUNOMARCAÇÃO DO PCNA POR WESTERN BLOT EM Córnea APÓS 6 DIAS DA LESÃO.....	77
5.6 IMUNOMARCAÇÃO DA CONEXINA 37 POR WESTERN BLOT.....	78
5.7 IMUNOMARCAÇÃO DA CONEXINA 40 POR WESTERN BLOT.....	79
5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	80
6 DISCUSSÃO.....	85
7 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

Nos organismos multicelulares, a organização e a função individual das células são controladas por mecanismos inerentes à própria célula ou através da comunicação intercelular. A maioria das células possui dois diferentes mecanismos de comunicação intercelular. O primeiro é a comunicação mediada por fatores de crescimento ou por hormônios, neste caso, as células não precisam ter contato direto. No segundo, para que haja a comunicação intercelular, as células precisam estar em contato direto umas com as outras (GOODENOUGH et al., 1996; YAMASAKI, 1990).

A comunicação direta entre células ocorre através das junções GAP (JG), essas junções são estruturas protéicas formadas por 12 unidades de proteínas conhecidas como conexinas (TRAUB et al., 1998; YAMASAKI et al., 1997; YAMASAKI et al., 1999). As JG permitem a passagem de íons e pequenas moléculas de peso molecular inferior a 1000 Da entre o citosol de células conectadas. Entre as moléculas que permeiam as JG estão o inositol 1,4,5 trifosfato e o íon cálcio (YAMASAKI; NAUS, 1996).

A comunicação intercelular através das JG é considerada um mecanismo crucial para a manutenção da homeostasia celular, regulando atividades como o controle do crescimento e da diferenciação celular, a resposta vasoativa das células endoteliais e a condução elétrica nos tecidos excitáveis (GOODENOUGH et al., 1996; HÜLSER *et al.*, 1998; POLACEK et al., 1997; ROZENTAL et al., 2000; SAFFITZ; YAMADA, 2000; STEINBERG, 1998; YAMASAKI et al., 1999).

Embora vários trabalhos demonstrem a presença da conexina 43 (Cx43) na célula endotelial e relacionem-na com patologias vasculares, pouco se sabe acerca da capacidade efetiva da comunicação entre as células endoteliais e, principalmente sobre o papel da Cx43 no processo de angiogênese. As células endoteliais expressam as conexinas 37 (Cx37), 40 (Cx40) e 43 (LITTLE et al., 1995; PEPPER et al., 1992). Porém, no endotélio vascular existem diferenças no modelo de distribuição de determinadas Cxs expressas nas junções. Essas diferenças de distribuição das Cxs podem contribuir para a modulação de diferentes funções na parede vascular (YEH et al., 1997).

Diversas funções especializadas do endotélio requerem uma efetiva capacidade de comunicação entre as células endoteliais e as células da parede vascular (POLACEK et al., 1997). Durante a formação de novos vasos, por exemplo, as células endoteliais do cérebro fetal humano apresentam alta expressão da Cx43, que não é normalmente detectada do tecido cerebral já formado (ERREDE et al., 2002).

A formação de novos vasos sanguíneos é um processo fisiológico extremamente importante que ocorre em diversos momentos durante a vida dos organismos animais, presente nas reparações teciduais e durante o ciclo reprodutivo das fêmeas. Porém, são nas patologias que esse processo recebe maior atenção, como na artrite reumatóide e retinopatia diabética (FOLKMAN; SHING, 1992). Dentre os processos patológicos influenciados pela angiogênese, talvez um dos mais estudados seja o crescimento e metastatização de neoplasias sólidas (FOLKMAN, 1976).

Os camundongos geneticamente modificados, portadores de deleção em um dos alelos da conexina 43 (Cx 43^{+/-}) tornaram-se importantes para ajudar na elucidação da participação dessa Cx durante a neovascularização. Nesta dissertação de mestrado as alterações em relação quantidade de vasos formados na córnea desses camundongos bem como a proliferação vascular e expressão das Cx37, Cx40, Cx43 foram estudadas e comparadas com camundongos selvagens para a Cx43 (Cx 43^{+/+}).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COMUNICAÇÃO INTERCELULAR

Embora as células possuam aparatos independentes para manter suas próprias funções, algumas condutas e o próprio crescimento celular, dependem da interação com células vizinhas. A manutenção e a homeostasia tecidual são resultado da comunicação e da interação de uma célula com outra célula mais próxima (YAMASAKI, 1990).

A maioria das células possui duas maneiras de se comunicarem, uma delas é a comunicação mediada por hormônio no qual o contato entre células é dispensado. Na comunicação através de hormônios, se distinguem três variantes: a endócrina, a parácrina e a autócrina. Quando a célula secreta no meio extracelular o hormônio sinalizador, e que terá sua ação em outra unidade celular, mas no mesmo tecido, denominamos de parácrina. Porém, quando a unidade celular encontra-se em outro órgão, e o hormônio produzido alcança a célula alvo através da corrente sanguínea denominamos de endócrina. E finalmente, a sinalização autócrina quando a célula secreta o hormônio no meio extracelular e que terá sua ação no mesmo tipo celular que o produziu (DUKES, 1984).

Uma outra forma de comunicação intercelular é mediada pelo contato direto entre células. As células adjacentes transferem sinais de comunicação entre si através de canais intercelulares. Existem três tipos de moléculas envolvidas no

contato direto entre células, classificadas de acordo com a função que desempenham as junções de oclusão que atuam no sentido de restringir a passagem de substâncias pelo espaço entre as células, as junções de ancoramento que promovem adesão de uma célula à outra ou a elementos da matriz extracelular e por fim as junções GAP (JC), que promovem a comunicação entre as células (YAMASAKI, 1990; YAMASAKI; NAUS, 1996).

2.2 AS JUNÇÕES GAP

A junção GAP (JG) é a única forma de comunicação direta de sinais entre células vizinhas (Figura 1). Esta junção é considerada mecanismo crucial para a manutenção da homeostasia celular além de várias outras atividades como a regulação do crescimento e diferenciação celular, resposta vasoativa das células endoteliais e condução elétrica nos tecidos excitáveis (GOODENOUGH et al., 1996; HÜLSER et al., 1998; POLACEK et al., 1997; ROZENTAL et al., 2000; SAFFITZ; YAMADA, 2000; STEINBERG, 1998; YAMASAKI et al., 1999).

As JG podem ser encontradas em quase todos os tecidos dos mamíferos exceto nas células da circulação sanguínea e nas células musculares esquelética adulta. Diversas conexinas expressam características do próprio tecido e sua distribuição celular nos animais adultos implica em diferenciação funcional entre os diferentes tipos de canal (YAMASAKI; NAUS, 1999).

Figura 1 – Contato de duas membranas plasmáticas mostrando a presença das junções GAP. A conexina (subunidade protéica) é a unidade da JG, o arranjo de seis conexinas forma um conexon (em destaque no círculo). Cada conexon une-se a outro conexon da célula adjacente (destaque retangular), completando a JG. A figura também evidencia o espaço existente entre as membranas plasmáticas das células adjacentes. Onde ocorre a presença das placas juncionais há um espaço de 3.5 nm enquanto que em outras regiões, o espaço é de 20 nm (Adaptado de EVANS; MARTIN, 2002)

Estudos ultraestruturais, funcionais e eletrofisiológicos a fim de identificar e caracterizar as proteínas que formam a junção GAP, as Cxs, mostraram que as junções formam poros que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas entre o citosol das células conectadas (STEINBERNG, 1998). Os canais permitem a passagem de moléculas com peso molecular inferior a 1000 Da, possibilitando assim a transmissão de moléculas como o segundo mensageiro inositol 1,4,5 trifosfato e o íon cálcio (YAMASAKI; NAUS, 1996). Vários outros pequenos metabólitos tais como nucleotídeos, açúcares, aminoácidos e adenosina monofosfato também foram

identificados como moléculas que são transferidas através de junções GAP (BEYER; PAUL; GOODENOUGH, 1990).

O contato direto entre as células induz o desenvolvimento das junções intercelulares através das membranas plasmáticas adjacentes. O primeiro passo na formação da junção intercelular envolve o contato das células por meio de moléculas de adesão celular. Há uma correlação positiva entre a expressão das moléculas de adesão celular e as proteínas das junções GAP (YAMASAKI; NAUS, 1996).

As junções GAP são compostas por dois hemicanais, que é sua unidade ultraestrutural, chamadas de conexons. Os conexons são cilindros protéicos que formam um canal hidrofílico. Estes estão presentes na membrana plasmática das células e se ligam a conexons de células adjacentes formando os canais intercelulares. Cada hemicanal é composto por seis unidades de proteínas (Figura 2) (TRAUB et al., 1998; YAMASAKI et al., 1997; YAMASAKI et al., 1999).

Figura 2 – Desenho esquemático de um hemicanal (conexon) que é formado por seis unidades de conexina. O conexon da direita apresenta-se aberto, ou seja, as conexinas estão dispostas formando um canal que permite a passagem de substâncias com peso molecular inferior a 1000 Da. O conexon da esquerda está fechado, ou seja, as conexinas estão dispostas de forma a não permitir a passagem de substâncias entre o citoplasma de células adjacentes (Adaptado de SÖHL; WILLECKE, 2004)

Assim, cada canal de junção GAP é composto por 12 conexinas. A diversidade de canais que pode ser formada ocorre pela presença de mais de um tipo de conexina na junção. A constituição de cada conexon contribui para a seletividade dos canais podendo formar canais homotípicos, heterotípicos, homoméricos e heteroméricos (Figura 3). Um canal homomérico homotípico é composto por 12 subunidades de conexina iguais. Já um canal heterotípico homomérico, é formado por dois conexons diferentes, sendo cada um deles constituído por seis conexinas iguais. E, por fim, canais heteroméricos, que são aqueles formados pela união de conexons diferentes constituídos também por diferentes conexinas (BEYER et al., 2000; GOODENOUGH et al., 1996; STEINBERG, 1998; ROZENTAL et al., 2000).

Figura 3 – Possibilidade de arranjo de conexinas para formar diferentes canais de comunicação (Adaptado de EVANS; MARTIN, 2002)

A existência de JG formados por diferentes conexinas que resulta em poros de JG com diferentes condutâncias elétricas e propriedades voltagem dependente ficou evidenciada em diversos estudos eletrofisiológicos como o realizado por Brink (1996). Outros autores sugerem que os poros das JG além de apresentarem cargas elétricas selecionam moléculas pelo seu tamanho (VEENSTRA et al., 1995). As células que expressam pelo menos dois tipos de conexinas possuem canais intercelulares com diferentes condutividades. As células são capazes de expressar conexinas de formas diferentes desenvolvendo assim funções variadas em relação à comunicação entre células (GOODENOUGH et al., 1996; STEINBERG, 1998).

Outros estudos *in vitro* também demonstraram que a permeabilidade, condutância e outras propriedades das JG são dependentes do tipo de conexinas que formam o canal (ELFGNG et al., 1995; VEENSTRA et al., 1995). A possibilidade da combinação de diversas conexinas para a formação do canal pode contribuir para uma diferenciação funcional nos diferentes tecidos (YEH et al., 1997).

As JG podem ser encontradas na maioria dos tecidos nos mamíferos, exceto nas células do sangue e célula muscular esquelética. Com o isolamento de vários genes da conexina (Cx), pesquisadores têm estudado a especificidade da expressão de algumas proteínas da JG em determinados tecidos. Várias Cxs exibem a característica do próprio tecido, implicando em diferenciação funcional entre eles (BEYER et al., 2000; NICHOLSON et al., 2000; STEINBERG, 1998; YAMASAKI; NAUS, 1996). A figura 4 mostra a presença de JG entre duas células endoteliais por meio de microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 4 – Micrografia eletrônica de transmissão do endotélio capilar. Notar aderências juncionais (em destaque). Quando visualizadas no maior aumento notar estrutura pentalaminar da junção GAP (Adaptado de FIGUEROA; ISAKSON; DULING, 2004)

2.3 AS CONEXINAS

Nos mamíferos, as conexinas são codificadas por uma família multigênica representada nos camundongos por 20 genes e nos humanos por 21 genes (SÖHL; WILLECKE, 2004; WILLECKE et al., 2002). Desses genes identificados nas duas espécies, apenas 19 deles apresentam homologia. Os camundongos possuem o gene da Cx33 que no genoma humano não estão presentes, em contrapartida, os humanos apresentam os genes da CX25 e CX59 não presentes nos camundongos. A razão biológica para isso é desconhecida, além disso, as conexinas ortólogas não são

necessariamente expressas nos mesmos tecidos e, nem pelas mesmas células (SÖHL; WILLECKE, 2004). O cDNA que codifica as conexinas revela regiões de alta homologia e regiões de pequena ou nenhuma homologia, de forma que se estabeleceu uma classificação das conexinas representadas pelos pesos moleculares, relacionadas aos diferentes tecidos (Cx 26, Cx 30.3, Cx 31, Cx 31.1, Cx 33, Cx 32, Cx 37, Cx40, Cx 43, Cx 45, Cx 46, Cx 50) (GOODENOUGH et al., 1996; YAMASAKI; NAUS, 1996).

As conexinas possuem uma estrutura básica comum que consiste em quatro domínios transmembrânicos conservados conectados a duas alças extracelulares, também conservadas, e uma citoplasmática. A alça citoplasmática e o COOH-terminal são únicos para cada conexina enquanto o NH₂-terminal é conservado como demonstrado na figura 5 (BEYER, 1993).

Figura 5 – Modelo de uma conexina. Os cilindros representam os domínios transmembrânicos (M1-M4). As alças entre os primeiro e o segundo domínios transmembrânicos e entre o terceiro e o quarto domínio são extracelulares (E1 e E2, respectivamente, cada uma com três resíduos conservados de cisteína (Adaptado de SÖHL; WILLECKE, 2004)

Com base nas suas similaridades estruturais protéica, a família multigênica foi dividida em duas classes α e β . A classe α contém $\alpha 1$ (Cx43) e $\alpha 2$ (Cx38) e a classe β contém $\beta 1$ (Cx32) e $\beta 2$ (Cx26) e $\beta 3$ (Cx31) (SAINIO et al., 1992).

A síntese da Cx43 é regulada por mecanismos transcricionais e pós transcricionais, seguido da oligomerização das seis subunidades da conexina dentro de hemicanais no complexo de Golgi, sendo então translocado para membrana plasmática. A translocação até a membrana plasmática ocorre devido à atração a locais onde haja conexons de células adjacentes formando o emparelhamento intercelular, unindo a cada dois conexons, até formar um canal completo (GIRÃO; PEREIRA, 2003; NAUS et al., 1993).

Simultaneamente a formação dos canais tipo GAP, ocorre a fosforilação das conexinas. A conexina 43, por exemplo, é fosforilada em vários sítios da carboxila terminal. Acredita-se que a Proteína Quinase dependente de AMP cíclico (PKA), V-SRC, C-SRC ZO-1 sejam responsáveis por essa fosforilação (TROSKO; RUCH, 1998).

A fosforilação da Cx43 regula a reunião de junções tipo GAP para formar conexons funcionais na membrana plasmática, redireciona a conexina na membrana e altera a probabilidade de abertura e o fechamento do canal (CAMERON et al., 2003).

A degradação das conexinas ocorre através dos lisosomos e proteosomos e é estimulada pela sua própria fosforilação, no entanto esse mecanismo não está bem esclarecido (GIRÃO; PEREIRA, 2003; NAUS et al., 1993)

2.4 A CONEXINA 43

A Cx43 foi primeiramente descrita no coração, hoje se sabe que ela está presente em diversos tecidos. Os camundongos nulo-zigóticos (nocautes) para o gene da conexina 43 (Cx43^{-/-}), morrem ao nascer devido a uma má-formação ventricular cardíaca (REAUME et al., 1995; STEINBERG, 1998). Yamasaki e Naus (1996) descreveram a expressão da conexina 43 nos seguintes órgãos e tecidos: coração, fígado, útero, ovário, pulmão, cérebro, testículo, estômago, intestino, córnea, tecido ósseo, placenta, cristalino e pele. Nesses tecidos e órgãos, a conexina pode estar presente nos miócitos, astrócitos, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, células epididimais, células de Leyding, macrófagos, osteócitos, células B pancreáticas, células foliculares da tireóide, células epiteliais e trofoblastos gigantes.

No coração dos mamíferos, a Cx43 é a mais abundante nas junções intercelulares (BEYER; PAUL; GOODENPGH, 1987; YANCEY et al., 1989). Porém, a Cx43 não foi detectada em todos os tecidos cardíacos. Nos nodos sinoatriais e atrioventriculares de ratos (VAN KEMPEN, 1991) e de humano e bovino (OOSTHOEK et al., 1993) a Cx43 não foi detectada.

Na córnea dos animais, a Cx43 está presente nas células endoteliais e nos queratinócitos (RATKAY-TRAUB et al., 2001). *In vitro*, a conexina 43 é considerada a principal proteína constituinte da junção GAP do endotélio (DAVIES et al., 1997; DEPAULA et al., 1999).

2.5 CONEXINAS NA PAREDE VASCULAR E CÉLULAS ENDOTELIAIS

A presença de quatro conexinas foi constatada na parede vascular através da detecção do RNA mensageiro, detecção de proteína e outros métodos indiretos: Cx43 (LITTLE et al., 1995; PEPPER et al., 1992; POLACEK et al., 1993; POLACEK et al., 1997; REED et al., 1993; VANRIJEN, et al., 1997), Cx40 (BRUZZONE et al., 1993; GROS et al., 1994; LITTLE et al., 1995; VANRIJEN et al., 1997), Cx37 (LARSON et al., 1995; LARSON et al., 1997; TRAUB et al., 1998; VANRIJEN et al., 1997; VEENSTRA et al., 1992) e a Cx45 (KRÜGER et al., 2000).

As células musculares lisas da parede vascular expressam predominantemente a Cx43 e, em alguns momentos, Cx40 (LITTLE et al., 1995). Já as células endoteliais expressam as Cx37, Cx40 e Cx43 (LITTLE et al., 1995; PEPPER et al., 1992). As funções especializadas do endotélio requerem uma comunicação intercelular entre as próprias células endoteliais, entre as células endoteliais e os monócitos e entre as células endoteliais e outras células da parede vascular (POLACEK et al., 1997).

Existem evidências de que as conexinas também exercem papel importante na transmigração de linfócitos através do endotélio. É possível que a sinalização entre células endoteliais seja modificada em condições patológicas como na inflamação, em que a migração trans-endotelial é essencial no recrutamento das células para resolução de um processo inflamatório (OVIEDO-ORTA et al., 2002).

Estudos *in vitro* demonstraram que no endotélio vascular existem diferenças no modelo de distribuição de determinadas conexinas expressas nas junções GAP. A

expressão diferencial das conexinas pode contribuir na modulação da função das junções nos diferentes segmentos da parede vascular (YEH et al., 1997).

A expressão das Cx37, Cx40 e Cx43 foram estudadas em arteríolas de mesentério de ratos através de imunofluorescência. A expressão das Cx40 e Cx43 foi abundante nas maiores arteríolas (30-40 μ m) assim como nas arteríolas terminais e capilares. A Cx37 foi encontrada na maioria, mas não em todas as arteríolas estudadas. Já as vênulas mesentéricas, não apresentaram marcação para nenhuma conexina (GUSTAFSSON et al., 2003).

Embora as células endoteliais expressem as Cx37, Cx40 e Cx43 (LITTLE et al., 1995; PEPPER et al., 1992), nos grandes vasos como aorta de camundongos, as células endoteliais expressam predominantemente as conexinas 37 e 40 (SIMON; McWHORTER, 2002). Em estudos com animais deficientes em conexinas 37 e 40, Simon e McWhorter (2002) mostraram a importância dessas proteínas para o desenvolvimento normal e manutenção do sistema vascular de camundongos. Animais que apresentam deficiência das Cx37 e Cx40 morrem após o primeiro dia de nascimento e apresentam severas anormalidades vasculares em pele, testículos, intestino, estômago e pulmões. Em outro estudo, esses mesmos autores verificaram a comunicação intercelular e os níveis das Cx37 e Cx40 em células endoteliais de aorta de camundongos em fase embrionária. Houve diminuição da comunicação intercelular nos animais deficientes da Cx40 sendo que, nos animais mais novos, essa diminuição foi mais acentuada. Não foi observada diferença na comunicação intercelular nos animais deficientes da Cx37, porém, nos animais que apresentavam deficiência das Cx37 e Cx40 a comunicação foi interrompida. A ausência de uma

conexina resultou na superexpressão da outra mostrando uma mútua dependência para máxima expressão no endotélio vascular (SIMON; MCWHORTER, 2003).

A Cx43 apresenta alta expressão nas células endoteliais no cérebro fetal em desenvolvimento, possivelmente relacionado à formação dos vasos no córtex cerebral, pois, no cérebro humano já formado, a Cx43 não é detectada. A Cx43 também apresenta alta expressão nas células endoteliais de astrocitomas. A alta expressão desta proteína de junção GAP no cérebro em desenvolvimento bem como em tecido cerebral tumoral, pode estar relacionada ao desenvolvimento vascular cerebral e angiogênese tumoral (ERREDE et al., 2002).

Em célula endotelial e célula muscular lisa de vasos cerebrais bem como no cremaster de ratos foram observadas as Cx43 e Cx40. Ambas as proteínas foram identificadas através de imunofluorescência indireta e, em muitos casos, foram identificadas na mesma placa juncional (LITTLE et al., 1995).

Yeh et al. (1997), estudaram a localização e expressão de conexinas nas células endoteliais na artéria aorta de ratos. Demonstraram que a maioria das células expressa simultaneamente as Cx40 e Cx43, embora algumas junções expressavam somente uma ou outra conexina. Após três anos, Yeh et al. (2000), mostraram que as conexinas estão distribuídas e expressas diferentemente nas diversas fases de vida dos ratos. O estudo foi novamente realizado em aorta de ratos e envolveram as conexinas 37, 40 e 43. As três conexinas, em geral, tiveram sua expressão máxima no nascimento. A Cx43 apresentou declínio progressivo com o tempo enquanto que, a Cx40 manteve alta expressão durante todo o experimento. Por sua vez, a Cx37 apresentou várias oscilações. Essa diferenciação na expressão das conexinas indica que a comunicação intercelular no endotélio, não é estacionária após o nascimento,

e sugerem que complicados mecanismos e interações estão envolvidos na regulação individual das conexinas.

Em diversos tecidos e células, o RNA da Cx37 foi identificado, tais como coração, útero e ovário de rato, coração de camundongo, células endoteliais da veia umbilical de humanos, células endoteliais aórtica bovina e célula muscular lisa de aorta de rato (REED et al., 1993). Camundongos com fenótipo deficiente da Cx37 apresentam hemorragia intensa e esterilidade das fêmeas (EVANS; MARTIN 2002). Cultura de células endoteliais proveniente de aorta bovina e endotélio bovino apresentou altos níveis de RNA das Cx37 e Cx40, porém na cultura de células endoteliais proveniente de vasos de pequeno calibre da retina somente a Cx43 apresentou alta expressão (REED et al., 1993). Esse resultado mostra mais uma vez que o padrão de expressão das conexinas nas células endoteliais é muito variado.

Gabriels e Paul (1998) realizaram um estudo a fim de identificar e avaliar o padrão de distribuição das conexinas nas células endoteliais de aorta de ratos *in situ*. As Cx37 e Cx40 foram as mais freqüentes nas aortas torácica e abdominal. Em contrapartida, a Cx43 não foi detectada na maioria das células endoteliais, porém apresentou grande abundância nas células próximas a regiões de grande turbulência sanguínea. Quando uma ligadura parcial do vaso foi realizada, diminuindo o fluxo sanguíneo em aproximadamente 30%, houve grande aumento da Cx43 após 8 dias do procedimento, indicando que o estresse pode elevar a expressão da Cx43 nas células endoteliais de grandes vasos.

2.6 ANGIOGÊNESE

A angiogênese, formação e crescimento de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes é um processo fisiológico dos organismos, responsável pelo crescimento, manutenção e maturação dos tecidos normais (FOLKMAN; SHING, 1992; LICHTENBERG et al., 1997).

No organismo adulto, a formação vascular aparece nos processos de regeneração endometrial e nas reparações teciduais. Mas, são em algumas patologias, que a neovascularização têm maior importância como é o caso da artrite reumatóide, psoríase, retinopatia diabética e no crescimento dos tumores. Nas neoplasias, a neovascularização é responsável pelo seu crescimento e disseminação (CARMELIET; JAIN, FOLKMAN; SHING, 1992; FOLKMAN, 1995; LICHTENBERG et al., 1997).

Um grande número de fatores angiogênicos funciona como mecanismo protetor do tecido normal e são ativados quando a neovascularização deve ocorrer, mas também promovem uma formação vascular patológica em certas doenças (ANDRADE et al., 1997). Sob condições de equilíbrio, o endotélio vascular possui baixa taxa de proliferação, onde figuras de mitoses são raramente observadas. Porém, quando as células são estimuladas, saem do estado Go e dão início ao processo de divisão celular. As células que constituirão os novos vasos sanguíneos são formadas por duplicação simples, que mantêm sua capacidade mitótica mesmo após a especialização (ALBERTS et al., 1994).

Em animais adultos, a angiogênese se apresenta como um processo multifacetado, composto de diversas fases que requerem estudo mais aprofundado. A ligação entre angiogênese e inflamação é evidente, os dois processos são muito próximos, devido ao número de fatores que modulam ambos os mecanismos, levando à profunda inter-relação entre eles (RISAU, 1997). O processo dentro o qual essa íntima relação entre angiogênese e inflamação fica demonstrada é durante a reparação tecidual (ROBBINS, 1994).

A neovascularização também contribui para o aporte de células inflamatórias à lesão. A migração de granulócitos através de vasos neoformados foi observada por Cliff (1965), quando estudou a cinética da cicatrização através do implante de câmaras transparentes em orelhas de coelhos.

2.7 ETAPAS DE NEOFORMAÇÃO VASCULAR

O processo de angiogênese é dividido em quatro etapas, iniciando com a degradação da matriz extracelular adjacente, seguida da migração celular, proliferação e reorganização das células endoteliais para formar o tubo capilar. Os vasos que irão fornecer as células endoteliais para a formação dos brotos capilares dilatam-se. Logo após, ocorre à degradação da matriz extracelular do tecido adjacente através da síntese e secreção de enzimas proteolíticas pelas células endoteliais, permitindo que estas consigam penetrar na membrana basal. Assim, a

célula endotelial consegue migrar na direção da fonte de um estímulo angiogênico (AUERBACH et al., 2003; FOLKMAN, 1982; FOLKMAN; SHING, 1992).

Ainda segundo Folkman e Shing (1992), simultaneamente a essa migração ocorre à proliferação celular. As células alinham-se formando tubos capilares, e depositam a matriz extracelular contribuindo assim para a morfogênese. Nos vasos em crescimento, é rara a presença de pericitos, células semelhantes à musculatura lisa, que envolvem os capilares endoteliais, eles somente aparecerão nos capilares maduros. A figura 6 mostra esquematicamente a estrutura de um capilar sanguíneo.

Figura 6 – Desenho esquemático de um capilar sanguíneo. Notar a presença de duas células endoteliais e a interfase entre elas. Externamente ao capilar, a presença de uma lâmina basal. As células endoteliais apresentam poros embora nem todo capilar apresente (Adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995)

2.8 COMUNICAÇÃO ENTRE CÉLULAS ENDOTELIAIS

O endotélio responde imediatamente as alterações de fluxo sanguíneo, com mudanças na concentração intracelular de moléculas e íons. Esta comunicação entre células ocorre pela migração de moléculas através das junções GAP (DAVIES et al., 1997; DEPAOLA et al., 1999).

Durante um reparo endotelial, a migração das células é coordenada pela transmissão de sinais entre células vizinhas. Este reparo que pode ocorrer na reparação endotelial de uma área lesada ou, durante a formação de um broto capilar no processo de angiogênese (PEPPER et al., 1989).

A comunicação entre células da parede vascular ainda não está totalmente entendida. Acredita-se que a comunicação através de canais é importante na vasodilatação arteriolar. A comunicação entre o endotélio e a célula muscular lisa possivelmente controla o tônus nos vasos de grande calibre (PEPPER et al., 1992). Rozental et al. (2000), relatam que a coordenação do tônus dos vasos se deve à produção e distribuição de óxido nítrico através das junções intercelulares.

Alguns estudos têm relacionado às conexinas das células endoteliais com diversas patologias vasculares. Haefliger e Meda (2000) demonstraram que na hipertensão crônica em ratos há uma alteração da expressão da Cx43 nas células musculares lisas da parede dos vasos, sugerindo que a comunicação entre células mediada pela Cx43 pode contribuir para a regulação da elasticidade da parede vascular. Em geral, houve aumento da expressão da Cx43 acompanhado por uma maior elasticidade do vaso.

Liao et al. (2001) também relacionaram a expressão da Cx43 com as alterações vasculares. Utilizando camundongos com deleção da Cx43 especificamente nas células endoteliais, verificaram que a não expressão da Cx43 no endotélio provocou hipotensão e bradicardia nesses animais. Essa hipotensão estava associada à elevação plasmática de nitrato (indicador da produção de óxido nítrico) e a presença de angiotensina I e angiotensina II no plasma sanguíneo (LIAO et al., 2001).

Severs et al. (2001) relataram alteração na expressão de conexinas em células musculares lisas das paredes dos vasos que apresentavam alteração de fenótipo durante a progressão de lesões de arteroesclerose e após injúria nas arteríolas. Em modelos de estudo *in vivo* de hipertensão, os animais apresentam diminuição da expressão da Cx40 nas células endoteliais de arteríolas e, isso parece estar relacionado ao sistema renina-angiotensina. Da mesma maneira, animais que apresentam deleção do gene da Cx40 são naturalmente hipertensos (RUMMERY; HILL, 2004).

Ainda sobre a Cx40, camundongos que apresentam deficiência da Cx40 apresentam arritmia atrial, uma vez que esta conexina está localizada nas células endoteliais principalmente do tecido cardíaco (EVANS; MARTIN, 2002).

2.9 MODELOS DE ESTUDO DE VASOS NEOFORMADOS

O estudo dos vasos neoformados vem sendo realizado em função do desenvolvimento de diferentes modelos experimentais que reproduzem a angiogênese. A formação de vasos pode ser estudada *in vitro* através das culturas celulares, como por exemplo, anel aórtico de rato em gel de colágeno, células endoteliais capilares ou células aórtica bovina; permitindo assim, uma avaliação quantitativa do processo. Esses modelos fornecem informações essenciais para uma primeira análise, mas devem ser interpretados cautelosamente. A cinética e quimiotaxia da célula endotelial assim como sua proliferação e a formação tubular precisam ser estudadas *in vivo* (AUERBACH et al., 2003).

A experimentação *in vivo* tende a ser mais complexa e de difícil execução, pois muitas vezes, necessita de procedimento cirúrgico e demanda mais tempo. Porém, é essencial que seja realizada devido à natureza complexa da resposta vascular, que muitas vezes, pode diferenciar dos estudos *in vitro* (AUERBACH et al., 2003).

Um dos primeiros modelos desenvolvidos para o estudo da neovascularização foi o implante de câmaras transparentes em orelhas de coelhos realizado por Sandison (1928) que pôde observar a proliferação de novos vasos para o interior da câmara. Alguns tecidos, pela característica de transparência, têm sido utilizados no estudo dos eventos dinâmicos da angiogênese, tais como: córnea, membrana cório-alantóide, mesentério e cremaster (NICIPORCITAS, 1992).

A membrana cório-alantóide de ovo embrionado começou a ser utilizada experimentalmente pelos embriologistas há mais de 50 anos. E, ainda hoje, é

utilizada como selecionador rápido de substâncias com possível atividade angiogênica ou anti-angiogênica (FOLKMAN, 1985). A quantificação da neovascularização tem sido aprimorada permitindo mensurar as possíveis alterações após contato com diferentes substâncias (AUERBACH et al., 2003).

A utilização do mesentério de rato, assim como do músculo cremaster são modelos que permitem, por transparência, a observação dos vasos formados. A angiogênese pode ser avaliada após a inoculação de substâncias, ferimentos cirúrgicos ou implante tumoral (NORRBY et al., 1990; SCHOEFL, 1963).

O tecido subcutâneo também pode ser utilizado para estudo da angiogênese. O modelo de indução de bolsa de ar com posterior injeção de agentes irritantes (ISAJI et al., 1989) ou com introdução de pedaços de esponja está sendo cada vez mais utilizado. Andrade et al. (1997) estudaram a angiogênese no subcutâneo de camundongos por meio do implante pequenas esponjas em forma de disco, constituídos de poliéster e poliuretano. Segundo os autores, este modelo é de fácil execução, permite a avaliação do potencial angiogênico e anti-angiogênico de substâncias e possibilita a quantificação e análise dos vasos formados.

2.10 CAUTERIZAÇÃO CORNEAL COM CRISTAL DE NITRATO DE PRATA

O modelo de cauterização corneal com cristal de nitrato de prata, assim como os de implantes corneais de polímeros ou frações tumorais sólidos, são ainda hoje um dos modelos mais explorados de neovascularização. Sua principal vantagem é

pelo fato do tecido corneano ser, na maioria das espécies animais, e inclusive nos camundongos, um tecido avascular. Além disso, sendo predominantemente transparente, a córnea não representa barreira para a visualização do crescimento de vasos em seu estroma a partir de um estímulo, sendo, portanto um tecido de excelência para o estudo da neovascularização (JAIN et al., 1997; KLINTWORTH, 1977; KNIGHTON et al., 1983).

Após a cauterização da córnea com cristal de nitrato de prata, pode-se observar crescimento de vasos neoformados a partir do plexo pericorneal, sendo possível descrever as etapas da neoformação vascular bem como, a permeabilidade dos vasos sob microscopia de luz comum e microscopia eletrônica (SCHOEFL, 1963).

2.11 ESTRUTURA HISTOLÓGICA DA CÓRNEA

A córnea, estrutura que limita a porção anterior do bulbo ocular constitui uma barreira contra agressões externas (DYCE et al., 1990). Trata-se de uma estrutura não pigmentada e avascular que se divide em quatro camadas distintas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Figura 7). O epitélio é do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado compreendido por várias camadas de células poliédricas e cilíndricas que ficam aderidas à membrana basal através de hemidesmossomos (KIRSCHNER, 1990).

O estroma corresponde cerca de 90% da espessura total da córnea sendo constituídos por fibras colágenas dispostas paralelamente, fibrócitos, ceratócitos,

substância fundamental e, ocasionalmente linfócitos, macrófagos e neutrófilos (SLATTER, 1990).

A membrana Descemet é elástica e composta por filamentos de colágeno finos está sujeita a protusões quando o epitélio e o estroma são lesados (SLATTER, 1990). À microscopia eletrônica de transmissão observam-se duas camadas pouco definidas sendo uma adjacente ao estroma, composta pelo colágeno tipo II, e a outra com características de membrana basal (WARING, 1984).

O endotélio caracteriza-se por uma camada única de células hexagonais ou poligonais e são estruturalmente interligadas através de desmossomos (GIRARD, 1981).

Figura 7 – Desenho tridimensional da córnea. Notar a presença do epitélio pavimentoso estratificado formado por células poliédricas e cilíndricas, logo abaixo a membrana basal e o estroma com a presença de fibroblastos (Adaptado de HOGAN; ALVARADO; WEDDELL, 1971. apud JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995. p. 397)¹

1- HOGAN, J.; ALVARADO, J. A.; WEDDELL, J. E. Histology of the human eye, Saunders, 1971.

2.12 INVASÃO VASCULAR NA CÓRNEA

O endotélio vascular, sob condições de homeostase, possui baixa taxa de proliferação, com raras figuras de mitoses, tendo como função suprir adequadamente os tecidos (ALBERT et al., 1989).

Porém, a vascularização corneal é um importante processo que permitirá a regeneração e cicatrização do tecido corneano. Sua ocorrência é comum após infecções induzidas por microorganismos, injúrias traumáticas ou após injúria por substâncias químicas. Nos casos em que a camada superficial da córnea é atingida, há formação de vasos que se originam do limbo. Quando a lesão afeta o estroma corneano, os vasos originam-se por anastomose das artérias ciliares (KLINTWORTH, 1977).

Muitos fatores influenciam o crescimento vascular e várias teorias foram propostas para explicar essa formação. Diferentes tipos celulares participam deste processo através da produção de fatores angiogênicos. Uma explicação aceita é que a migração das células endoteliais ocorre de uma região de baixa concentração de determinada substância para uma região com alta concentração desta substância. Um ou mais fatores são capazes de iniciar um crescimento capilar direcional (KLINTWORTH, 1977).

Algumas células foram descritas como participantes da neovascularização como os linfócitos (SIDKY; AUERBACH, 1975), mastócitos (NORRBY et al., 1989), possivelmente os neutrófilos (SHAW et al., 2003) e os macrófagos devido a sua grande atividade secretora de fatores angiogênicos (SUNDERKOTTER et al., 1990).

A participação dos macrófagos ficou evidenciada após um experimento realizado por Clark e colaboradores (1976) no qual macrófagos implantados nas córneas de coelhos poderiam induzir neovascularização corneal. Os fatores produzidos por macrófagos somente são secretados quando estas células estão ativadas, com sua atividade fagocítica aumentada. Esta ativação pode ocorrer por produtos microbianos, por citocinas ou por baixas tensões de oxigênio (KNIGHTON et al., 1983).

Shaw e colaboradores (2003) mostraram em experimento utilizando córnea de camundongos uma acentuada diminuição da angiogênese em um grupo de animais com neutropenia em comparação com camundongos controle, sugerindo que os neutrófilos participassem da angiogênese através de liberação de fatores estimulatórios. Alguns desses fatores angiogênicos tais como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), TGF α e TGF β 1 (transforming growth factor), foram identificados em córnea através de marcação imunoistoquímica durante o processo de neovascularização de diferentes patologias de córnea (CURSIEFEN et al., 2000). Outras substâncias indutoras de angiogênese como a prostaglandina E₁ e E₂, TNF α (Fator de necrose tumoral), fatores de crescimento de fibroblasto (aFGF/bFGF) e as interleucinas 1 e 8 estão envolvidas na neovascularização corneal de humanos (CURSIEFEN; SCHÖNHERR, 1997, ROCHELS, 1984, CHENG et al., 1998).

A angiogênese ou formação de novos vasos no organismo adulto é quase inexistente e esta limitada a algumas condições como no reparo tecidual, regeneração endometrial e desenvolvimento de processos (Andrade et al., 1997). Como processo fisiológico dos organismos, a angiogênese é responsável pelo

crescimento, manutenção e maturação dos tecidos normais (FOLKMAN; SHING, 1992).

A importância do estudo da neovascularização se deve principalmente ao fato deste processo estar presente em uma série de condições patológicas. Podemos destacar a artrite reumatóide, psoríase, retinopatia diabética e no crescimento e disseminação dos tumores (CARMELIET; JAIN, FOLKMAN; SHING, 1992; FOLKMAN, 1995; LICHTENBERG et al., 1997).

Patologias não neoplásicas podem ocorrer por excesso ou por falta de formação de vasos. A neovascularização ocular e a artrite reumatóide, por exemplo, aparecem quando há aumento da expressão de substância que promovem angiogênese, como é o caso do VEGF ou aumento do número de células inflamatórias que secretam fatores angiogênicos. Na psoríase, a vascularização em excesso ocorre devido aos baixos níveis trombospondina que deveriam inibir a formação de vasos. Já as úlceras duodenais são relativamente deficientes de capilares sanguíneos (FOLKMAN, 1995).

Nas patologias neoplásicas, a angiogênese a cada ano recebe maior importância. É através dos vasos neoformados que a massa tumoral consegue se expandir. Essa expansão tumoral não ocorre somente pela perfusão sanguínea, mas estimulação parácrina das células tumorais através de numerosos fatores de crescimento e pelas proteínas da matriz que são produzidas pelas células endoteliais dos novos capilares (HAMADA, et al., 1992).

A angiogênese também é importante na disseminação de tumores, as bases biológicas do mecanismo de metástase ainda é pouco compreendido, razões pelas quais as metástases aparecem anos após a remoção do tumor primário, por

exemplo, ainda não foram bem esclarecidas (FOLKMAN, 1995). Desta maneira estudos científicos com finalidade de entender um pouco mais sobre o complicado processo de angiogênese, ajudariam controlar doenças relacionadas a neovascularização. Diversos fatores anti-angiogênicos vem sendo identificados ao longo desses anos, muitos deles com aplicações clínicas, mas ainda pouco se sabe a respeito do processo de formação de vasos. Uma maneira de entender a formação de novas células endoteliais e a eficiente organização a fim de formar o tubo sanguíneo pode ser através da elucidação da comunicação entre as células endoteliais.

O estudo das conexinas nas células endoteliais no momento de formação de vasos pode ajudar a entender esse processo, numa tentativa de interferir e controlar esse mecanismo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da deleção de um dos alelos da Cx43 na neovascularização experimentalmente induzida através da cauterização com cristal de nitrato de prata em córnea de camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os vasos neoformados após a cauterização com nitrato de prata em camundongos heterozigotos (Cx43^{+/-}), deficientes da conexina 43 comparando com camundongos selvagens (Cx43^{+/+}).
- Estudar a proliferação das células endoteliais de córnea de camundongos por meio da detecção do PCNA por Western blot.
- Avaliar a expressão da Cx43 em córnea de camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} por Western blot.

- Avaliar a influência da deleção de um dos alelos da Cx43 sobre a expressão das Cx37 e Cx40 nas células endoteliais de córneas de camundongos por Western blot.

- Identificar por meio de microscopia eletrônica de transmissão as membranas celulares e as junções comunicantes nas membranas endoteliais durante o processo de neovascularização.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos deficientes em Cx43 originalmente estabelecidos por Reaume et al. (1995), e comprados dos Laboratórios Jackson pela International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, França, e que foram doados pelo Dr. Hiroshi Yamasaki (Kanagawa – Japão) ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde se encontram atualmente. O background genético original desses camundongos era proveniente da linhagem C57BL/6, a qual foi cruzada com camundongos CD1 para gerar camundongos heterozigotos (Cx43^{+/-}) deficientes em Cx43, e com background genético da linhagem CD1. Os camundongos (nocautes) nulo-zigotos para Cx43 (cx43^{-/-}) morrem ao nascer devido à má formação cardíaca (REAUME et al., 1995), e por isso, não serão utilizados nestes experimentos.

Esses animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em gaiolas de polipropileno com top filter (microisoladores), recebendo água filtrada e ração comercial Guabi® *ad libitum*. As salas onde os animais eram mantidos apresentam temperatura de 22± 2°C, umidade relativa do ar de 40 a 75%, com 20 trocas de ar filtrado/hora. O fotoperíodo tem ciclo de luz de 12 horas de claro e 12 horas de escuro controlado por “timer” marca L&D®. É considerado um biotério de

animais de padrão sanitário convencional controlado. Este projeto foi previamente apreciado e aprovado pela Comissão de Bioética da FMVZ-USP, protocolo número 322/2003.

4.2 CERTIFICADO DE BIOSSEGURANÇA E NORMAS PARA A MANUTENÇÃO E TRABALHOS EM CONTENÇÃO COM ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS

O biotério do Departamento de Patologia da FMVZ – USP, bem como o Laboratório de Oncologia Experimental, possuem extensão do certificado de biossegurança da FMVZ USP (CQB nº 100/99). De acordo com as informações da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), com base na instrução normativa da CTNBio nº 12, publicada no Diário Oficial da União nº 100-E, de 28 de maio de 1998, Seção 1, páginas 10 –12. Os animais estão alojados em sala isolada na área de criação do Biotério da FMVZ-USP, que foi especialmente preparada para receber esses animais. Para tanto, foram vedadas todas as possíveis passagens de inseto e de camundongos. Os animais encontram-se em caixas com filtros apropriados. Há cartazes indicativos da presença desses animais nos locais em que os mesmos são manipulados.

4.3 GENOTIPAGEM

Para a genotipagem dos camundongos, utilizou-se a técnica de extração Salting Out, para isso, um fragmento de cerca de 1 cm da cauda, foi cortado e imediatamente acondicionado em nitrogênio líquido. As caudas foram mantidas em freezer a -80°C até a análise. Para a extração do DNA, as caudas foram maceradas e colocadas em um tampão de extração contendo a proteinase K (Tris HCl 50mM, EDTA 10mM, SDS 0,5% e proteinase K 1,5mg/mL). As caudas em meio a esta solução foram colocadas em banho-maria a 65°C durante 2 horas. Após este período de incubação, foram acrescidas as amostras 100µL de NaCl 6M e os tubos agitados vigorosamente. As amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Cerca de 0,7 mL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo contendo 500µL de etanol absoluto a fim de precipitar o DNA. Após nova centrifugação, o DNA foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 0,5 mL de TE e mantido a 4°C até amplificação. O DNA foi solubilizado à 65°C durante 30 minutos e a quantificação a 280nm numa diluição de 1:20.

A amplificação do DNA foi realizada com primers da Life Technologies do Brasil Ltda, aliquotados de forma que a concentração ficasse 0,5mM. Os primers foram: Cx43 senso 5'CCCCACTCTCACCTATGTCTCC3' e anti-senso 5'ACTTTTGCCGCCT AGCTATCCC3' neo senso 5'GGCCACAGTCGATGAATCCAG 3' e anti-senso 5'TATCCATCATGGCTGATGCAA 3' (YAMAKAGE et al., 1998). A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada durante 1 ciclo, na condição de 94°C por 2

minutos, 35 ciclos a 94°C por 30s, 55°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos, 1 ciclo a 72°C por 4 minutos e 1 ciclo a 4°C por 60 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose preparado na concentração de 1,5% (diluído em tampão TBE) a 70W por 40 minutos. Posteriormente o gel foi corado por 15 minutos com brometo de etídeo. Os genes da Cx43 e neo foram amplificados e fotografados no aparelho Image Master Plus®.

4.4 CAUTERIZAÇÃO CORNEAL

Para se estudar a neovascularização em córnea de camundongos, um estímulo químico, físico (traumático), ou até mesmo implante de células, exsudatos inflamatórios e microrganismos deve ocorrer, causando uma lesão no epitélio corneano que estimulará a neovascularização no intuito de promover o reparo tecidual. Neste experimento provocamos a lesão na córnea através da cauterização com cristal de nitrato de prata (Adaptado de MUTHUKKARUPPAN; AUERBACH, 1979). As córneas foram removidas e analisadas 2 e 6 dias após a lesão.

4.4.1 – Anestesia

Os camundongos foram anestesiados por meio da administração de anestésico injetável intraperitoneal pentobarbital sódico (Hypnol® 3%), na dose de 60mg/Kg. Quando os animais estavam em plano anestésico, uma gota de colírio anestésico local (Visonest®) foi instilado em cada olho.

4.4.2 – Cauterização Corneal

Foi realizada mediante o posicionamento de ponta de cristal de nitrato de prata na região central das córneas de ambos os globos oculares, com o auxílio de uma pinça, durante 10 a 15 segundos, para provocar a lesão.

4.4.3 – Analgesia Pós-cauterização

A fim de minimizar o incomodo da cauterização corneal, foram administrados 3 doses do opióide bupremorfina na dose de 0,1mg/Kg por via subcutânea a cada 12 horas.

4.5 COLHEITA DO MATERIAL PARA ANÁLISE DA MORFOLOGIA VASCULAR

Os animais foram novamente anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol® 3%) na dose de 90mg/Kg por via intraperitoneal. Quando anestesiados, os animais receberam 500 U.I. de heparina também por via intraperitoneal, para evitar a coagulação do sangue durante a exsangüinação. Em seguida, foi realizada uma incisão cutânea na linha média. A musculatura da parede abdominal logo abaixo do diafragma foi incisada e afastada. Então realizou-se a abertura da cavidade torácica através da incisão do diafragma seguida da secção mediana do esterno. Com a cavidade torácica aberta realizou-se exsangüinação através da incisão na ponta do ventrículo direito. Através da introdução de uma cânula no interior do ventrículo esquerdo administrou-se 10 mL de PBS, a fim de limpar os leitos dos vasos. Feito isso, foram administrados 10 mL de tinta da China (Faber-Castell®, preto) para o preenchimento dos leitos vasculares. Então os globos oculares foram enucleados e fixados em formol a 10%.

Ao passar 48 horas, os globos oculares foram desidratados em soluções crescentes de álcoois (50° GL, 60°GL, 70°GL, 80°GL, 95°GL e absoluto, 24 horas em cada solução), diafanizados em benzol (duas passagens de 24 horas cada) e, posteriormente, mantidos em solução de salicilato metila e benzoato de benzila (método de Spaltholz, proporção 5:3). Em seguida, seccionou-se as córneas em 2 partes iguais e cada fragmento foi estendidos por 24 horas entre duas lâminas presas com pregadores. As lâminas foram montadas em resina sintética (Permout®), entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de luz comum.

4.6 COLHEITA DO MATERIAL PARA *WESTERN BLOT* E ULTRAESTRUTURA

Para análise ultraestrutural e para detecção de proteínas, os animais foram eutanasiados com sobredose de pentobarbital sódico por via intraperitoneal e as córneas armazenadas em glutaraldeído e nitrogênio líquido respectivamente.

A eutanásia dos animais (com sobredose de anestésico) foi realizada conforme recomendações internacionais (CCPA, 1998).

4.7 MORFOMETRIA DOS VASOS NEOFORMADOS

As áreas preenchidas com tinta da China são correspondentes aos vasos neoformados. Os vasos foram quantificados em sistema de análise de imagem computadorizado (Image-Pro-Plus®), a fim de se avaliar a proporção da área da córnea ocupada por vasos sanguíneos.

Os vasos foram observados com aumento de 40 vezes (objetiva de 4 vezes) e então quantificados. As imagens dos vasos repletos de tinta da China foram então captadas por câmara de televisão acoplada ao computador. Foram utilizados dois métodos para avaliação da neovascularização.

O primeiro destina-se a quantificação dos vasos neoformados nas córneas através da área de ocupação vascular. Foram utilizados campos imediatamente acima do plexo pericorneal medindo 638 mm². Essa medida foi estabelecida no

sistema de análise de imagem, permitindo padronizar a avaliação. Pelo fato da córnea ser um tecido avascular, todos os vasos encontrados na região pré-estabelecida correspondem a vasos neoformados. Em seguida, a porcentagem de ocupação por vasos recém formados foi calculada.

O segundo método visou mensurar o comprimento dos vasos neoformados, e verificar se esses atingiram a lesão. O maior vaso formado foi mensurado a partir do plexo peri-corneal até a broto capilar. À distância entre o plexo peri-corneal e a borda da lesão também foi mensurada a fim de verificar qual a porcentagem de alcance dos vasos, ou seja, verificar se os vasos atingiram a lesão e se não atingiram, qual foi a porcentagem de alcance. Desta forma, desconsideramos variações referentes ao tamanho da córnea dos animais.

4.8 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para estimar a Cx43, Cx37, Cx40 e PCNA nos tecidos de camundongo Cx43^{+/-} e Cx43^{+/+} (córnea) foi utilizado a técnica do *Western blot*. Para tanto, foi realizada a extração das proteínas de fragmentos de tecidos oriundos de camundongos machos e fêmeas, Cx43^{+/-} e Cx43^{+/+}. Imediatamente após a eutanásia dos animais, a córnea foi seccionada e acondicionada em nitrogênio líquido. O tecido foi submetido à lise celular através de homogeneização no Tissue Teator^{tu}, em Tris-HCl 1M, contendo SDS 10% e glicerol 10% e, então centrifugado à 15000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi separado e acrescido de Tris-HCl 1M, contendo SDS 10%,

glicerol 10%, DTT 1M e PMSF 10mM e posteriormente centrifugado à 13000 rpm por 15 minutos. Após a determinação da proteína total através do reagente BioRad Protein Assay (Bio-Rad Labs, Hercules, CA), realizou-se eletroforese com 150µg de proteína com o azul de bromofenol em gel de poliacrilamida 13%, a 60W e posteriormente a 110V. Logo após a eletroforese, as proteínas foram transferidas a 48mA, 7V durante 50 minutos para uma membrana de difluoreto de polivinilideno PDVF (Trans-Blot SD cell; Bio-Rad Labs), previamente umedecida com metanol. Após a transferência, a membrana foi incubada com leite desnatado (skim milk) 5%, diluído e, TTBS por 2 horas sob leve agitação a temperatura ambiente.

4.9 DETECÇÃO DAS Cx37, Cx40, Cx43 E PCNA POR MEIO DE *WESTERN BLOT*

Para a detecção da Cx37, as membranas foram incubadas em uma solução de anticorpo primário Cx37 monoclonal (Alpha Diagnostic International®) diluído em TTBS 0,2 contendo Skim Milk 1% (1:500), durante 12 horas, em caixa de isopor com gelo em movimentos lentos. Após incubação, a membrana foi lavada 3 vezes durante 10 minutos cada com TTBS e, então incubada com anticorpo secundário monoclonal conjugado com a peroxidase (1:500) durante 2 horas em temperatura ambiente em movimentos lentos.

As membranas utilizadas para detecção da Cx40 e Cx43 foram incubadas respectivamente com uma solução de anticorpo primário Cx40 policlonal (Chemicon®) diluído em TTBS 0,2 contendo Skim Milk 1% (1:500) e anticorpo

primário Cx43 policlonal (Sigma – Aldrich, Missouri, USA) diluído em TTBS 0,2 contendo Skim Milk 1% (1:500). Após as lavagens foram novamente incubadas com anticorpo secundário policlonal conjugado com a peroxidase (1:500) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado com a peroxidase (1:1000) respectivamente.

E por fim, para a detecção do PCNA, utilizou-se solução de anticorpo primário PCNA mouse monoclonal (Sigma – Aldrich, Missouri, USA) diluído em TTBS 0,2 contendo Skim Milk 1% (1:500) e solução de anticorpos secundário monoclonal anti-mouse conjugado com a peroxidase (1:500) da mesma forma relatado acima.

A revelação das membranas foi feita utilizando solução contendo diaminobenzidina (Sigma – Aldrich, Missouri, USA), sulfato de níquel e peróxido de hidrogênio a 30%, sendo bloqueada em água e após seca a membrana escaneada.

4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Fragmentos representativos de córnea foram colhidos e fixados. Para tanto, uma gota de fixador foi instilada sobre cada olho. Os olhos foram removidos com o auxílio de uma tesoura. As córneas foram então separadas do restante das estruturas oculares, foram obtidos fragmentos menores sobre placa de parafina, e esses foram imersos em fixador. As estruturas foram mantidas em fixador glutaraldeído 2,5 a 3% em tampão fosfato (pH 7,2) por 48 horas a 4°C. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio a 1% durante 60 minutos, e posteriormente, tratadas pelo acetato de uranila 0,5% durante 1 noite, desidratados em acetona e

incluídos em Araldite 502 (Luft, 1961). Desses blocos, foram obtidos cortes semifinos (700-900 nm) em ultramicrotomo (MT-5000 Sorwall), que foram corados pelo azul de toluidina, e analisados em microscopia de luz comum para a eleição das áreas mais representativas, das quais foram obtidos cortes ultrafinos (60-70 nm) e então observados em microscópio eletrônico de transmissão GEOL M-10. As eletromicrografias foram obtidas com câmera de 70 mm.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação das médias obtidas através da análise morfométrica (porcentagem de ocupação vascular e alcance do maior vaso formado) foi utilizado o teste ANOVA, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Dunn ou pós Teste Tukey-Kramer, com nível de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 - MORFOLOGIA E QUANTIFICAÇÃO VASCULAR APÓS 2 DIAS DA CAUTERIZAÇÃO CORNEAL

A mensuração da área de preenchimento dos vasos corados com a tinta da China, na córnea de camundongos machos e fêmeas foi realizada 2 dias após a cauterização corneal. Em seguida foi calculada a porcentagem de preenchimento vascular de uma área previamente estabelecida de 638 mm². A mensuração do maior vaso formado também foi realizada e a porcentagem de alcance calculada.

A tabela 1 mostra os resultados de camundongos machos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} 2 dias após a cauterização corneal. Os camundongos Cx43^{+/+} apresentaram uma área média de ocupação vascular de 137,3 mm² (Figura 8A). Esta área representa 21,53% de ocupação vascular, que é maior em relação aos machos Cx43^{+/-} 64,0 mm² de ocupação vascular (Figura 9A), representando 10,04% da ocupação vascular.

A porcentagem média de ocupação vascular é apresentada no gráfico 1. Os camundongos machos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} apresentaram uma diferença significativa entre os grupos de ambos os genótipos. Entre os camundongos Cx43^{+/+} a porcentagem de ocupação vascular foi de 21,53% e entre os camundongos Cx43^{+/-} foi de 10,04%.

O comprimento médio entre o plexo peri-corneal e a borda da lesão observado nestes camundongos foi de 990,77 μm . Entretanto, a média do maior vaso formado entre os camundongos machos Cx43^{+/+} foi de 875,35 μm . Este valor representa uma porcentagem de alcance de 88,35%. Entre os camundongos machos Cx43^{+/-} a média do maior vaso formado foi de 672,34 μm , representando 67,86% de alcance. Estes resultados podem ser visualizados na tabela 2.

No gráfico 2 estão demonstradas as médias dos alcances dos vasos dos camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}. Os camundongos Cx43^{+/+} apresentaram um alcance médio de 88,35% e os camundongos Cx43^{+/-} de 67,86%.

Tabela 1- Área ocupada por vasos neoformados, preenchido com tinta da China nos camundongos machos após 2 dias da cauterização corneal

Grupos	N	Área média de ocupação vascular (mm^2)	% área tomada por vasos na córnea (média e desvio padrão)
Cx43 ^{+/+}	14	137,3	21,53 $\pm$ 6,18
Cx43 ^{+/-}	12	64,0	10,04* $\pm$ 2,42

Os vasos foram marcados com tinta da China e quantificados em Sistema de análise de imagens ImageProPlus. **N** = número de animais utilizados. Cx43^{+/+}: camundongos selvagens. Cx43^{+/-}: camundongos heterozigotos. * estatisticamente significativo pelo teste Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Dunn, sendo considerado significativo $p < 0.001$

Gráfico 1 – Área percentual média ocupada por vasos neoformados 2 dias após a cauterização corneal em camundongos machos. A cauterização foi realizada com cristal de nitrato de prata e os vasos neoformados marcados com tinta da China. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heretozigotos para a Cx43. * resultados estatisticamente significante pelo teste Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Dunn $p < 0.001$

Tabela 2 - Comprimento médio do maior vaso formado em córnea (μm) de camundongos machos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} 2 dias após a cauterização corneal

Grupos	N	Comprimento médio do maior vaso (μm)	% de alcance dos vasos (média e desvio padrão)
Cx43 ^{+/+}	14	875,35	88,35 $\pm$ 19,28
Cx43 ^{+/-}	12	672,34	67,86 $\pm$ 19,57

Vasos preenchidos com tinta da China. O maior vaso formado foi mensurado e a porcentagem de alcance calculada. **N** = número de animais utilizados. Cx43^{+/+}: camundongos selvagens. Cx43^{+/-}: camundongos heterozigotos. Não houve diferença estatística significante entre os grupos utilizando Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Tukey-Kramer ($P > 0.05$)

Gráfico 2 – Porcentagem média do alcance do maior vaso formado 2 dias após a cauterização corneal em camundongos machos. A cauterização foi realizada com cristal de nitrato de prata e os vasos marcados com tinta da China. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heretozigotos para a Cx43. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos utilizando Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Tukey-Kramer ($P > 0.05$)

Os resultados referentes à cauterização corneal efetuada nos camundongos fêmeas estão apresentados na tabela 3. As fêmeas Cx43^{+/+} analisadas 2 dias após a cauterização corneal apresentaram área média de ocupação vascular de 140,1 mm², o que corresponde a uma porcentagem de ocupação vascular de 21,98% (Figura 8B). As fêmeas Cx43^{+/-} tiveram 80,5mm² de ocupação por vasos neoformados representando 12,63% de ocupação (Figura 9B). A maior taxa de neovascularização foi observada entre as fêmeas selvagens (Cx43^{+/+}).

A diferença entre a porcentagem de ocupação por vasos neoformados entre as fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, estão representadas no gráfico 3. A taxa observada foi de 21,98% e 12,63%, respectivamente.

Os resultados referentes ao comprimento de vasos das fêmeas 2 dias após cauterização são mostrados na tabela 4. O comprimento do maior vaso formado não

foi estatisticamente significativa entre as fêmeas. O comprimento médio do maior vaso formado para as fêmeas Cx43^{+/+} foi de 923,02 μ m e para as fêmeas Cx43^{+/-} foi de 803,06 μ m. Esses valores representam uma porcentagem de alcance de vasos de 87,80% e 85,09%, respectivamente, levando em consideração a distância média entre o plexo peri-corneal e a borda da lesão que foi de 943,79 μ m.

O gráfico 4 mostra as porcentagens de alcance dos vasos formados, no qual uma pequena diferença entre os grupos das fêmeas Cx43^{+/+} 87,80% e Cx43^{+/-} 85,09% foi observado.

Tabela 3 - Área ocupada por vasos neoformados nos camundongos fêmeas após 2 dias da cauterização corneal

Grupos	N	Área média de ocupação vascular (mm ²)	% área tomada por vasos na córnea (média e desvio padrão)
Cx43 ^{+/+}	15	140,1	21,98 $\pm$ 3,88
Cx43 ^{+/-}	13	80,5	12,63* $\pm$ 3,32

Para mensuração os vasos foram preenchidos com tinta da China e analisados em sistema de análise de imagens ImageProPlus. **N** = número de animais no grupo. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heterozigotos para a Cx43. * diferença estatística entre os grupos utilizando o teste Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Dunn (p<0.001)

Gráfico 3 – Área percentual média ocupada por vasos neoformados 2 dias após a cauterização corneal em camundongos fêmeas. A cauterização foi realizada com cristal de nitrato de prata e os vasos neoformados marcados com tinta da China. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heretozigotos para a Cx43. * resultados estatisticamente significante pelo teste Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Dunn $p < 0.001$

Tabela 4 - Comprimento médio do maior vaso formado em córnea (μm) de camundongos fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} 2 dias após a cauterização corneal

Grupos	N	Comprimento médio do maior vaso (μm)	% de alcance dos vasos (média e desvio padrão)
Cx43 ^{+/+}	15	923,02	87,80 $\pm$ 2,24
Cx43 ^{+/-}	13	803,06	85,09 $\pm$ 19,25

Vasos preenchidos com tinta da China. O maior vaso formado foi mensurado e a porcentagem de alcance calculada. **N** = número de animais utilizados. Cx43^{+/+}: camundongos selvagens. Cx43^{+/-}: camundongos heterozigotos. Não houve diferença estatística significante entre os grupos utilizando Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Tukey-Kramer ($P > 0.05$)

Gráfico 4 - Porcentagem média do alcance do maior vaso formado 2 dias após a cauterização corneal em camundongos fêmeas. A cauterização foi realizada com cristal de nitrato de prata e os vasos marcados com tinta da China. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heretozigotos para a Cx43. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos utilizando Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Tukey-Kramer ($P > 0.05$)

A área de neovascularização tanto para os machos quanto para as fêmeas Cx43^{+/+} foi maior em relação aos animais Cx43^{+/-} após 2 dias da cauterização corneal. Essa diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa. Quando comparamos machos e fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, os machos apresentam maior taxa de ocupação vascular embora não apresente diferença estatística significativa comparada às fêmeas. O gráfico 5 apresenta essas médias de ocupação vascular comparando machos e fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}.

Gráfico 5 - Área percentual de ocupação vascular em córnea de camundongos machos e fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, após 2 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Os vasos foram preenchidos com tinta da China. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heretozigotos para a Cx43

5.2 - MORFOLOGIA E QUANTIFICAÇÃO VASCULAR APÓS 6 DIAS DA CAUTERIZAÇÃO CORNEAL

Camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} machos e fêmeas foram avaliados 6 dias após a cauterização corneal em relação a área de ocupação por vasos neoformados e em relação ao alcance dos vasos.

A tabela 5 mostra os resultados obtidos com os camundongos machos após 6 dias da cauterização corneal. Camundongos Cx43^{+/+} apresentaram maior área de ocupação por vasos neoformados em relação aos machos Cx43^{+/-} sendo de 85,6 mm² e 50,2 mm² respectivamente (Figuras 10A e 11A). A porcentagem da área tomada por vasos na córnea desses animais foi de 13,43% para os Cx43^{+/+} e de 7,88% para os Cx43^{+/-}.

O gráfico 6 mostra mais uma vez, comparativamente a porcentagem de ocupação vascular dos animais Cx43^{+/+} (13,43%) e Cx43^{+/-} (7,88%).

O comprimento médio do maior vaso formado e a porcentagem de alcance do vaso para os machos Cx43^{+/+} foi de 749,32 µm e 75,63% respectivamente. Esses valores não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos machos Cx43^{+/-} que tiveram média de comprimento do maior vaso de 795,00 µm e 80,24% de alcance do vaso. A distância média entre o plexo-pericorneal e a borda da lesão foi de 990,77 µm. (Tabela 6).

Tabela 5 - Área ocupada por vasos neoformados nos camundongos machos após 6 dias da cauterização corneal

Grupos	N	Área média de ocupação vascular (mm ²)	% área tomada por vasos na córnea (média e desvio padrão)
Cx43 ^{+/+}	15	85,6	13,43 ± 4,61
Cx43 ^{+/-}	13	50,2	7,88* ± 4,04

Para mensuração os vasos foram preenchido com tinta da China e analisados em sistema de análise de imagens ImageProPlus. **N** = número de animais no grupo. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heterozigotos para a Cx43. * diferença estatística entre os grupos utilizando o teste Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Dunn (p<0.05)

Gráfico 6 – Área percentual média ocupada por vasos neoformados 6 dias após a cauterização corneal em camundongos machos. A cauterização foi realizada com cristal de nitrato de prata e os vasos neoformados marcados com tinta da China. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heretozigotos para a Cx43. * resultados estatisticamente significante pelo teste Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Dunn p<0.05

Tabela 6 - Comprimento médio do maior vaso formado em córnea (μm) de camundongos machos $\text{Cx43}^{+/+}$ e $\text{Cx43}^{+/-}$ 6 dias após a cauterização corneal

Grupos	N	Comprimento médio do maior vaso (μm)	% de alcance dos vasos (média e desvio padrão)
$\text{Cx43}^{+/+}$	15	749,32	75,63 $\pm$ 20,51
$\text{Cx43}^{+/-}$	13	795,00	80,24 $\pm$ 20,95

Vasos preenchidos com tinta da China. O maior vaso formado foi mensurado e a porcentagem de alcance calculada. **N** = número de animais utilizados. $\text{Cx43}^{+/+}$: camundongos selvagens. $\text{Cx43}^{+/-}$: camundongos heterozigotos. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos utilizando Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Tukey-Kramer ($P > 0.05$)

Gráfico 7 - Porcentagem média do alcance do maior vaso formado 6 dias após a cauterização corneal em camundongos machos. A cauterização foi realizada com cristal de nitrato de prata e os vasos marcados com tinta da China. **Cx43**^{+/+}: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43**^{+/-}: camundongos heretozigotos para a Cx43. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos utilizando Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Tukey-Kramer ($P > 0.05$)

A tabela 7 mostra os resultados referentes aos camundongos fêmeas utilizadas no experimento, analisadas após 6 dias da cauterização corneal. As fêmeas Cx43^{+/+} apresentaram média de ocupação vascular igual a 108,9 mm² (Figura 10B) e as fêmeas Cx43^{+/-} média igual a 71,5 mm² (Figura 11B). As fêmeas Cx43^{+/-} assim como os machos apresentaram menor ocupação por novos vasos. A porcentagem de ocupação foi de 11,21% e 17,09% das fêmeas Cx43^{+/-} e Cx43^{+/+} respectivamente.

Informações comparativas referente à porcentagem de ocupação vascular entre as fêmeas Cx43^{+/+} (17,09%) e Cx43^{+/-} (11,21%) estão dispostas no gráfico 8.

A tabela 8 apresenta a média do comprimento dos vasos neoformados na córnea e a porcentagem de alcance dos vasos das fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}. Em relação ao comprimento dos vasos os valores obtidos foram 812,19 µm e 771,73 µm para as fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} respectivamente. A distância média entre o plexo-pericorneal e a borda da lesão mensurada foi de 943,79 µm. A porcentagem de alcance do vaso foi 86,12% para fêmeas Cx43^{+/+} e de 81,77% para fêmeas Cx43^{+/-}.

As porcentagens de alcance dos vasos foram novamente representadas graficamente abaixo sendo Cx43^{+/+} (86,12%) e Cx43^{+/-} (81,77%) (Gráfico 9).

Tabela 7 - Área ocupada por vasos neoformados nos camundongos fêmeas após 6 dias da cauterização corneal

Grupos	N	Área média de ocupação vascular (mm ²)	% área tomada por vasos na córnea (média e desvio padrão)
Cx43 ^{+/+}	11	108,9	17,08 ± 3,88
Cx43 ^{+/-}	13	71,5	11,21* ± 3,67

Para mensuração os vasos foram preenchido com tinta da China e analisados em sistema de análise de imagens ImageProPlus. **N** = número de animais no grupo. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heterozigotos para a Cx43. * diferença estatística entre os grupos utilizando o teste Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Dunn (p<0.05)

Gráfico 8 – Área percentual média ocupada por vasos neoformados 6 dias após a cauterização corneal em camundongos fêmeas. A cauterização foi realizada com cristal de nitrato de prata e os vasos neoformados marcados com tinta da China. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heretozigotos para a Cx43. * resultados estatisticamente significante pelo teste Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Dunn $p < 0.05$

Tabela 8 - Comprimento médio do maior vaso formado em córnea (μm) de camundongos fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} 6 dias após a cauterização corneal

Grupos	N	Comprimento médio do maior vaso (μm)	% de alcance dos vasos (média e desvio padrão)
Cx43 ^{+/+}	11	812,19	86,12 $\pm$ 15,26
Cx43 ^{+/-}	12	771,73	81,77 $\pm$ 19,96

Vasos preenchidos com tinta da China. O maior vaso formado foi mensurado e a porcentagem de alcance calculada. **N** = número de animais utilizados. Cx43^{+/+}: camundongos selvagens. Cx43^{+/-}: camundongos heterozigotos. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos utilizando Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Tukey-Kramer ($P > 0.05$)

Gráfico 9 - Porcentagem média do alcance do maior vaso formado 6 dias após a cauterização corneal em camundongos fêmeas. A cauterização foi realizada com cristal de nitrato de prata e os vasos marcados com tinta da China. **Cx43^{+/+}**: camundongos selvagens para a Cx43; **Cx43^{+/-}**: camundongos heretozigotos para a Cx43. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos utilizando Anova, Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do pós Teste Tukey-Kramer ($P > 0.05$)

Á área de ocupação vascular entre camundongos $Cx43^{+/+}$ e $Cx43^{+/-}$ tanto macho quanto fêmeas apresentaram diferença estatística significativa. Quando comparamos animais do mesmo genótipo de sexos opostos, percebemos que as fêmeas apresentam maior taxa de ocupação vascular em relação aos machos. O gráfico 10 representa esquematicamente essa diferença.

Gráfico 10 - Área percentual de ocupação vascular em córnea de camundongos machos e fêmeas $Cx43^{+/+}$ e $Cx43^{+/-}$, após 6 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Os vasos foram marcados com tinta da China. **$Cx43^{+/+}$** : camundongos selvagens para a $Cx43$; **$Cx43^{+/-}$** : camundongos heretozigotos para a $Cx43$

A **B**

Figura 08 - Fotomicrografia obtida através de microscopia de luz, de córnea de camundongos Cx43^{+/+} após 2 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Notar a intensa vascularização da córnea onde os vasos foram preenchidos com tinta da China preta. **A**: camundongos machos; **B**: camundongos fêmeas

A **B**

Figura 09 - Fotomicrografia obtida através da microscopia de luz, de córnea de camundongos Cx43^{+/-} após 2 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Notar uma menor vascularização da córnea onde os vasos foram preenchidos com tinta da China preta. **A:** camundongos machos; **B:** camundongos fêmeas

A **B**

Figura 10 - Fotomicrografia obtida através de microscopia de luz, de córnea de camundongos Cx43^{+/+} após 6 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Notar uma maior vascularização da córnea onde os vasos foram preenchidos com tinta da China preta. **A**: camundongos machos; **B**: camundongos fêmeas

A **B**

Figura 11 - Fotomicrografia obtida através de microscopia de luz, de córnea de camundongos Cx43^{+/-} após 6 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Notar uma menor vascularização da córnea onde os vasos foram preenchidos com tinta da China preta. **A**: camundongos machos; **B**: camundongos fêmeas

5.3 IMUNOMARCAÇÃO DA CONEXINA 43 POR WESTERN BLOT

A técnica de Western blot foi realizada a fim de observar o padrão de marcação da Cx43 na córnea dos camundongos machos e fêmeas após 6 dias da lesão.

Como resultado do Western blot, obtivemos para os camundongos selvagens Cx43^{+/+} machos e fêmeas a presença de uma marcação fortemente positiva para a Cx43. Nessa marcação, podemos identificar 3 bandas que correspondem a fração não fosforilada, fosforilada e hiperfosforilada da Cx43. A fração não fosforilada da Cx43 corresponde a aproximadamente 43 kD.

As bandas formadas para camundongos heterozigotos Cx43^{+/-} apresentaram-se com menor intensidade, embora seguiram o mesmo padrão de marcação. Entre as bandas formadas para os camundongos Cx43^{+/+}, as bandas das fêmeas apresentaram com maior intensidade de marcação, representando maior expressão da Cx43.

Figura 12 - Western blot da expressão de proteína Cx43. As bandas correspondentes aos camundongos Cx43^{+/+} foram mais intensamente marcadas tanto para os machos quanto para as fêmeas em relação aos camundongos Cx43^{+/-}. O controle positivo da reação foi coração de camundongo (linha 10) . Foi colocado 150µg de proteína em cada well. A linha 1 representa marcador de peso. Linhas 2 e 3: camundongos Cx43^{+/+} machos. Linhas 4

e 5: camundongos Cx43^{+/+} fêmeas. Linhas 6 e 7: camundongos Cx43^{+/-} machos. Linhas 8 e 9: camundongos Cx43^{+/-} fêmeas. Notar a presença das bandas não fosforiladas, fosforiladas e hiperfosforiladas

5.4 IMUNOMARCAÇÃO DO PCNA POR WESTERN BLOT EM CÓRNEA APÓS 2 DIAS DA LESÃO

Da mesma maneira, o Western blot foi realizado a fim de detectar diferenças entre a imunomarcação do PCNA em córnea de camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, após 48 horas da lesão.

Como resultado obtivemos bandas mais intensamente marcadas nos camundongos Cx43^{+/+} tanto machos quanto fêmeas. Os camundongos Cx43^{+/-} tiveram uma marcação com menor intensidade, indicando uma menor proliferação celular.

Figura 13 - Western blot da expressão de proteína PCNA. As bandas correspondentes aos camundongos Cx43^{+/+} foram mais intensamente marcadas tanto para os machos quanto para as fêmeas em relação aos camundongos Cx43^{+/-}. Foi colocado 150µg de proteína em cada well. A linha 1 representa marcador de peso. Linhas 2 e 3: camundongos Cx43^{+/-} machos. Linhas 4 e 5: camundongos Cx43^{+/+} machos. Linhas 6 e 7: camundongos Cx43^{+/-} fêmeas. Linhas 8 e 9: camundongos Cx43^{+/+} fêmeas

5.5 IMUNOMARCAÇÃO DO PCNA POR WESTERN BLOT EM CÓRNEA APÓS 6 DIAS DA LESÃO

O Western blot foi realizado para detectar o PCNA, indicando proliferação celular nas córneas dos camundongos. Foram utilizadas córneas de camundongos machos e fêmeas que foram removidas após 6 dias da injúria.

As bandas marcadas para todos os camundongos foram iguais, não havendo, portanto diferença na marcação do PCNA entre machos e fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}.

Figura 14 - Western blot da expressão de proteína PCNA. As bandas correspondentes aos camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} foram igualmente marcadas tanto para os machos quanto para as fêmeas. A linha 1 representa marcador de peso. Linhas 2 e 3: camundongos Cx43^{+/-} machos. Linhas 4 e 5: camundongos Cx43^{+/+} machos. Linhas 6 e 7: camundongos Cx43^{+/-} fêmeas. Linhas 8 e 9: camundongos Cx43^{+/+} fêmeas

5.6 IMUNOMARCAÇÃO DA CONEXINA 37 POR WESTERN BLOT

O Western blot foi realizado para detectar a expressão da Cx37 na córnea de camundongos. Foram utilizadas córneas de camundongos machos e fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, removidas 6 dias após a cauterização corneal.

Como resultado do Western blot, obtivemos para os camundongos selvagens Cx43^{+/+} e heterozigotos Cx43^{+/-} o mesmo padrão de marcação, tanto para os machos quanto para as fêmeas.

Figura 15 - Western blot da expressão de proteína Cx37. As bandas foram igualmente marcadas para os camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} machos e fêmeas. Foi colocado 150µg de proteína em cada well. A linha 1 representa marcador de peso. Linhas 2 e 3: camundongos Cx43^{+/+} machos. Linhas 4 e 5: camundongos Cx43^{+/+} fêmeas. Linhas 6 e 7: camundongos Cx43^{+/-} machos. Linhas 8 e 9: camundongos Cx43^{+/-} fêmeas

5.7 IMUNOMARCAÇÃO DA CONEXINA 40 POR WESTERN BLOT

O Western blot foi realizado para detectar a expressão da Cx40 na córnea de camundongos. Foram utilizadas córneas de camundongos machos e fêmeas Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, removidas 6 dias após a cauterização corneal.

Como resultado do Western blot, obtivemos para os camundongos selvagens Cx43^{+/+} e heterozigotos Cx43^{+/-} o mesmo padrão de marcação, tanto para os machos quanto para as fêmeas.

Figura 16 - Western blot da expressão de proteína Cx37. As bandas foram igualmente marcadas para os camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} machos e fêmeas. Foi colocado 150µg de proteína em cada well. A linha 1 representa marcador de peso. Linhas 2 e 3: camundongos Cx43^{+/+} machos. Linhas 4 e 5: camundongos Cx43^{+/+} fêmeas. Linhas 6 e 7: camundongos Cx43^{+/-} machos. Linhas 8 e 9: camundongos Cx43^{+/-} fêmeas

5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Figura 17 - Eletromicrografia de material oriundo da córnea de camundongo Cx43^{+/+} após 6 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Notar a presença de vacuolização e desorganização do tecido corneano adjacente aos vasos inclusive com presença de vesículas pinocíticas no endotélio. Quanto as funções endoteliais não se observam grandes participações no processo

Figura 18 - Eletromicrografia de material oriundo da córnea de camundongo Cx43^{+/+} após 6 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Notar na interface das células endoteliais a presença da placa juncional formado por diversas junções do tipo gap

Figura 19 - Eletromicrografia de material oriundo da córnea de camundongo Cx43^{+/-} após 6 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Visão panorâmica do vaso onde se nota apenas um ligeiro comprometimento endotelial na adjacência vascular e presença de poucas vesículas pinocíticas

Figura 20 - Eletromicrografia de material oriundo da córnea de camundongo Cx43^{+/-} após 6 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Notar apenas um ligeiro comprometimento endotelial na adjacência vascular e presença de poucas vesículas pinocíticas

Figura 21 - Eletromicrografia de material oriundo da córnea de camundongo Cx43^{+/+} após 6 dias da cauterização com cristal de nitrato de prata. Evidenciamos nesta imagem a presença de placa juncional na interface das células endoteliais

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho nos utilizamos à cauterização corneal como modelo de estudos da angiogênese em camundongos. Trata-se de um modelo de simples execução e que permite a fácil visualização e quantificação dos vasos neoformados.

As diferenças observadas entre a angiogênese nos camundongos selvagens (Cx43^{+/+}) e heterozigotos para a Cx43 (Cx43^{+/-}) foram avaliadas em duas diferentes fases, nos dias 2 e 6 após cauterização corneal. Nessas fases, foi possível verificar diferenças entre os grupos de animais, em momentos diferentes da neovascularização.

A célula endotelial expressa de forma variada a Cx43 em função da localização da célula (BEYER; PAUL; GOODENPGH, 1987; YANCEY et al., 1989; VAN KEMPEN, 1991) e em função da fase de desenvolvimento vascular (ERREDE et al., 2002). Desta forma, os camundongos que apresentam um dos genes da Cx43 deletado possibilitaram confirmar *in vivo* diferenças na neovascularização quando comparados com camundongos geneticamente normais.

No estudo de neovascularização realizado por Ogawa et al. (1999), após um dia da cauterização corneal já foi possível visualizar vasos neoformados na córnea dos camundongos. Uma maior quantidade de vasos foi observado no quinto dia da lesão. A partir do sexto dia da lesão, observou-se uma redução da área de ocupação vascular. Em nossos estudos, no segundo dia após a lesão, uma grande quantidade de vasos foi visualizada na córnea dos camundongos e, no sexto dia após a cauterização, os vasos apresentaram diminuição da extensão e da área de ocupação

vascular. A diminuição da área de vascularização na córnea desses camundongos pode ser atribuída ao fato da reparação tecidual estar no final, e dessa forma, o processo inflamatório estaria diminuído.

A angiogênese observada em córnea, após a cauterização com cristal de nitrato de prata, entre camundongos dos dois diferentes genótipos foi diferente. Os camundongos Cx43^{+/-} apresentaram menor angiogênese, tanto no segundo quanto no sexto dia após a lesão. Esta diminuição da angiogênese foi caracterizada por uma menor área de ocupação vascular na córnea desses camundongos. Embora não tenha sido observada diferença entre o comprimento dos vasos formados, área de ocupação vascular foi estatisticamente significativa entre os camundongos de ambos os genótipos nos dois períodos avaliados. Outros estudos também relataram a importância da Cx43 durante o processo de neovascularização, por exemplo, na avaliação da expressão da Cx43 em córtex cerebral humano, uma alta expressão da Cx43 foi verificada por imunoistoquímica em feto com 18 semanas. Entretanto, a Cx43 não foi identificada em tecido cerebral adulto normal. A alta expressão da Cx43 observada no tecido em desenvolvimento sugere a importância da Cx43 nas junções GAP para a comunicação intercelular durante a angiogênese e formação da barreira hemato-encefálica (ERREDE et al., 2002).

Em astrocitomas também foi verificada alta expressão da Cx43 nas células endoteliais. A maior expressão sugere mais uma vez, que a Cx43 está relacionada à capacidade de proliferação vascular. No tecido tumoral, observa-se uma intensa atividade de neovascularização, que tem por finalidade, permitir o crescimento, nutrição e disseminação do tecido tumoral (ERREDE et al., 2002). Assim como observado nestes estudos, os nossos resultados mostraram que a Cx43 é importante

durante a formação de novos vasos. Em diferentes situações como no desenvolvimento tecidual, crescimento de tumores e reparação tecidual a Cx43 é importante durante a angiogênese.

Outra evidência da importância da Cx43 na proliferação das células endoteliais foi verificada através do tratamento dessas células com TGF- β 1 (Fator transformador de crescimento) por Larson et al. (1997). O TGF- β 1 é responsável pelo controle do crescimento vascular e modulação da comunicação intercelular em certas condições patofisiológicas. Durante a injúria, a reparação tecidual, a reestenose e a angiogênese, há um aumento da expressão da Cx43 nas células endoteliais (LARSON et al., 1997). O mecanismo de ação do TGF- β 1 para promover a neovascularização pode estar relacionado ao aumento da expressão da Cx43. O aumento na expressão desta conexina resulta no aumento da capacidade de comunicação intercelular resultando na formação de novos vasos. Da mesma maneira, em nossos experimentos, os camundongos que apresentaram maior expressão de Cx43 (camundongos selvagens) apresentaram maior neovascularização.

Outro resultado importante observado foi a diferença encontrada entre machos e fêmeas, após 2 e 6 dias da cauterização corneal. As fêmeas, após 6 dias da injúria corneal, apresentam maior taxa de ocupação vascular e maior comprimento de vaso formado em relação aos machos. Porém, essa diferença foi pequena entre fêmeas e machos após 2 dias da lesão. Essa maior taxa de angiogênese observada nas fêmeas, está relacionada a maior expressão da Cx43 em relação aos machos. Pela técnica de Western blot, as fêmeas após 6 dias da lesão apresentaram uma banda mais fortemente marcada, significando uma maior expressão da Cx43.

Alguns dados da literatura mostram que os hormônios gonadais femininos levam a um aumento da expressão da Cx43 (DI et al., 2001). A contração uterina durante o trabalho em mamíferos é precedida por um aumento da comunicação através de junções do tipo GAP coincidindo com o aumento da mRNA da Cx43 e dos níveis da proteína (BALDUCCI et al., LYE et al., 1993; TABB et al., 1992). Outros dois hormônios, estrógeno e estriol levam a um aumento das junções GAP das células do miométrio bem como o aumento da transcrição do mRNA da Cx43 (DI et al., 2001; KILARSKI et al., 2000; PETROCELLE; LYE, 1993). O aumento da comunicação entre as células do miométrio é essencial para a coordenação da contração uterina (DI et al., 2001). A influência dos hormônios gonadais femininos no aumento da expressão da Cx43 pode estar relacionado a maior angiogênese observada nas fêmeas em nossos estudos.

A ligação entre angiogênese e inflamação é explícita e, muitas vezes, a divisão entre os dois processos é tênue, fenômeno demonstrado pelo número de fatores que modulam ambos os processos, levando a inter-relação entre eles (RISAU, 1997). O processo pelos quais as relações entre angiogênese e inflamação são relatadas ocorre durante a reparação tecidual (ROBBINS, 1994). A formação de novos vasos contribui para o aporte de células inflamatórias para o foco da lesão. Durante a cicatrização, é possível identificar migração de granulócitos através dos vasos neoformados para promover a reparação tecidual (CLIFF, 1965). A diminuição da angiogênese nos camundongos Cx43^{+/-} observada neste trabalho, retrata uma menor resposta inflamatória desses animais. Embora a cicatrização e a reparação corneal não tenham sido analisadas, o fato dos camundongos Cx43^{+/-} apresentarem menor angiogênese, possivelmente também apresente uma reparação tecidual mais tênue.

A Cx43 foi previamente estudada durante um processo cicatricial. Qiu e colaboradores (2003), compararam a resposta inflamatória e o processo cicatricial entre um grupo tratado com RNA antisense para Cx43, que bloqueia temporariamente a transcrição da proteína com um grupo controle. Esse estudo utilizou modelos incisional e excisional de pele. Em ambos, o grupo antisense apresentou uma redução da resposta inflamatória e um processo cicatricial mais discreto e eficiente em relação ao grupo controle. Desta forma conclui-se que a supressão transitória da expressão da Cx43 nas fases iniciais da resposta inflamatória, previne uma subsequente amplificação e bloqueia a migração exuberante de leucócitos característico de uma resposta inflamatória. Em nossos estudos, nós verificamos uma menor neovascularização, ou seja, uma menor resposta inflamatória na córnea de camundongos que apresentaram menor expressão da Cx43. A Cx43 parece estar relacionada não somente ao processo de formação de vasos, como também apresenta importância durante todo o processo inflamatório.

No processo inflamatório crônico, a Cx43 também tem sua importância relatada. Camundongos Cx43^{+/-} apresentam granulomas menos exuberantes com menor quantidade de células em proliferação e maior deposição de elementos do tecido conjuntivo em comparação com camundongos Cx43^{+/+}. Esse fato pode ser resultado de um microambiente ideal, possivelmente mantido por uma rede de comunicação formada pelas junções do tipo GAP que contribuirão na estabilização da homeostase do cálcio, dissipando o estresse oxidativo e prevenindo a morte celular como resultado dos astrócitos (OLORIS et al., 2005) (NO PRELO)¹. A menor resposta inflamatória crônica observada nos animais Cx43^{+/-}, caracterizado por granulomas

1 - OLORIS, S.C.S.; SAKAI, K.; REIS, V. N. S.; SILVA, T. C.; MATSUZAKI, P.; SINHORINI, I. L.; GUERRA, J. L.; AVANZO, J. L.; MENSIL, M.Ç DAGLI, M. L. Z.; *Connexin 43* Connexin 43 modulates the evolution of *Schistosoma mansoni* egg-induced hepatic granuloma in mice. **American Journal of Pathology** (2005) (NO PRELO).

menos exuberantes, pode ser comparada a menor resposta inflamatória aguda nos animais Cx43^{+/-}, observado em nossos experimentos. De acordo com nossos resultados, animais Cx43^{+/-} apresentaram menor área de ocupação vascular, ou seja, tiveram uma menor resposta inflamatória.

Os resultados de Western blot para a Cx43, a partir de extratos protéicos de córnea de camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, mostraram a diferença dos níveis de proteínas entre os grupos. Os camundongos Cx43^{+/+} apresentaram maior quantidade de proteína em relação aos camundongos Cx43^{+/-}, tanto para os machos quanto para as fêmeas. O fato dos camundongos Cx43^{+/-} apresentarem deleção em um dos genes que codifica a Cx43, acarreta na diminuição proporcional de transcrição, tradução e expressão desta proteína. Entre os camundongos Cx43^{+/+}, as fêmeas apresentaram bandas mais fortemente marcadas em relação aos machos, significando maior expressão da Cx43.

A taxa de proliferação celular entre os camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-}, foi avaliado por Western blot efetuado contra o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). O PCNA tem papel extremamente importante no metabolismo do ácido nucléico. É uma proteína essencial para a replicação do DNA e está envolvido no reparo excisional do DNA, no agrupamento da cromatina e na transcrição do RNA (KELMAN, 1997). Sendo assim, células que estão em processo de divisão celular apresentam alta expressão do PCNA. Camundongos Cx43^{+/-}, que apresentaram uma angiogênese diminuída, também apresentaram uma menor expressão de PCNA no segundo dia após a cauterização corneal. Isso está relacionado à diminuição da angiogênese observada na córnea desses camundongos, resultado de uma menor taxa de proliferação celular.

Nós não verificamos diferença na detecção do PCNA entre os camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} no sexto dia após a lesão. Provavelmente após os 6 dias de cauterização, os vasos já estão formados e as células endoteliais não estão mais em processo de divisão, e os capilares sanguíneos já estariam em processo de involução.

Embora camundongos Cx43^{+/-}, durante o processo de neovascularização, apresentem menor taxa de proliferação endotelial, no desenvolvimento de neoplasias esses camundongos apresentam maior taxa de proliferação celular em relação aos animais selvagens. Esse é o resultado de estudos utilizando adenomas em pulmão, induzidos experimentalmente pela administração de uretana. Após a administração de uretana, camundongos Cx43^{+/-} apresentaram maior número e tamanho de nódulos nos pulmões quando comparados aos camundongos Cx43^{+/+}. Os camundongos heterozigotos apresentaram também lesões histológicas mais agressivas (AVANZO et al., 2004). A comunicação intercelular através das JG entre as células neoplásicas diminui durante a promoção tumoral favorecendo a expansão clonal das células iniciadas e após a transformação fenotípica das células (MENSIL, 2002).

Ao contrário das lesões neoplásicas, a proliferação das células endoteliais para promover o reparo do endotélio e a migração das células para a formação do broto capilar na angiogênese é coordenado pela comunicação entre células através das JG (PEPPER et al., 1989). Pelo fato de observarmos como resultado de nossos estudos uma menor neovascularização em córnea de camundongos que apresentam menor expressão da Cx43, acreditamos que as JG são importantes para passagem de sinais entre células endoteliais que coordenariam o processo de neovascularização.

Além da Cx43, duas outras conexinas são importantes nas células endoteliais: Cx37 e Cx40. As conexinas 37 e 40 parecem ser as mais comuns nas células endoteliais e são essenciais no processo de desenvolvimento vascular de camundongos. Camundongos que apresentam deleção nos genes da Cx37 e Cx40 morrem no primeiro dia pós-natal apresentando diversas alterações vasculares, tais como, hemorragias observadas na pele, testículo, tecido gastrointestinal e pulmões com pronunciada dilatação dos vasos sanguíneos e congestão em algumas áreas (SIMON; MCWHORTER, 2002).

A preocupação em verificar alterações nos níveis das Cx37 e Cx40 foi no sentido de evidenciar a influência da deleção de um dos alelos do gene da Cx43 durante a angiogênese. Neste estudo, as Cx37 e Cx40 foram avaliadas através de Western blot a partir das amostras de córnea com 6 dias após a cauterização. Pelo fato de serem conexinas importantes nas células endoteliais, comparamos os camundongos selvagens e heterozigotos. As Cx37 e Cx40 estão presentes em iguais quantidades em ambos os grupos. A menor expressão da Cx43 nos camundongos estudados não influenciou na expressão destas conexinas nas células endoteliais. A menor neovascularização observada nos camundongos heterozigotos poderia ser atribuída ao fato de haver uma conseqüente alteração das Cx37 e Cx40, mas isso não se confirmou. Dessa maneira, fica evidente que a Cx43 tem papel importante durante a angiogênese corneal.

Alteração dos níveis de Cx37 e Cx40 foram observadas em camundongos Cx37^{-/-} e Cx40^{-/-} (Knockout) pela técnica de Western blot. Simon e McWhorter (2003) detectaram maior expressão da Cx37 nos camundongos Cx40^{-/-} e uma menor expressão da Cx40 nos camundongos Cx37^{-/-}. Nesse estudo os autores utilizaram

cultura de células endoteliais derivadas daqueles camundongos. As Cx37 e Cx40 são importantes na comunicação intercelular em células endoteliais dos grandes vasos. A deleção da Cx40 causa uma diminuição de transferência substâncias fluorescentes através das junções GAP, já a deleção da Cx37 não interfere na transferência dessas substâncias. A deleção de ambas conexinas simultaneamente leva a completa perda da comunicação intercelular (SIMON; WCWHORTER, 2003).

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas da córnea de camundongos, 6 dias após a lesão, revelam a presença de vacuolização e desorganização do tecido corneano adjacentes aos vasos, principalmente nos camundongos Cx43^{+/+}. Nesses camundongos, observou-se também a presença de vesículas pinocíticas endoteliais mais exacerbadas. Possivelmente, os camundongos selvagens apresentem um maior comprometimento tecidual em relação aos camundongos heterozigotos, mas pelo fato de não termos imagens representativas, outros estudos são necessários para elucidar melhor esse fato. As eletromicrografias revelam também a presença de placas juncionais entre as células endoteliais. Essas placas, entre células endoteliais de capilares, já foram anteriormente visualizadas por outros autores (FIGUEROA; ISAKSON; DULING, 2004).

In vitro, a principal conexina expressa na célula endotelial é a Cx43 (DEPAULA, 1999). A expressão da Cx43 em cultura de células endoteliais bovinas varia conforme a densidade celular sugerindo uma íntima relação entre crescimento celular e expressão da Cx43 (LARSSON et al., 1990). Pepper et al. (1989), observaram a comunicação intercelular, através da passagem de Lucifer Yellow entre células endoteliais em cultura de células, posterior a uma lesão. Vinte quatro horas após a injúria celular, a comunicação atinge o pico máximo. Esta máxima

comunicação é mantida até o oitavo dia, onde ocorre a resolução da lesão. A comunicação entre células endoteliais através de junções GAP tem um papel importante na reparação tecidual, pois, a comunicação é responsável pela coordenação e migração da célula endotelial. Em nosso trabalho, a efetiva comunicação entre as células endoteliais não foi avaliada. Comparamos a angiogênese *in vivo* entre camundongos com menor expressão da Cx43 com camundongos normais. O fato da Cx43 ser uma proteína importante para a comunicação intercelular durante a reparação endotelial *in vitro*, nos permite acreditar, que a diminuição da angiogênese observada nos animais Cx43^{+/-} também ocorreu devido a uma menor comunicação entre as células endoteliais durante a neovascularização.

O conjunto de nossos resultados mostra uma diminuição da angiogênese em camundongos com um dos genes da Cx43 deletado. Dessa forma, a importância *in vivo* desta conexina na comunicação intercelular através de junções GAP durante a formação de novos vasos é evidente. A expressão da Cx43 durante a angiogênese parece estar relacionada a uma diminuição da comunicação entre as células endoteliais que não é suprida pelas a expressão das Cx37 e Cx40. Em suma, a menor expressão da Cx43 pode diminuir a coordenação e a migração da célula endotelial em direção a lesão a fim de promover a reparação tecidual.

7 CONCLUSÕES

- Camundongos que apresentam deleção em um dos alelos da Cx43 têm uma menor taxa de angiogênese em córnea, após um estímulo provocado pela cauterização com cristal de nitrato de prata;
- Camundongos heterozigotos Cx43^{+/-} apresentam menor área de ocupação por novos vasos em córnea em comparação aos camundongos selvagens (Cx43^{+/+});
- Não há diferença no comprimento do maior vaso formado entre camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-};
- Camundongos Cx43^{+/+} apresentam maior expressão de PCNA detectado por meio de Western blot após 2 dias da lesão em comparação a camundongos Cx43^{+/-}. Após 6 dias da cauterização corneal não há diferença de expressão do PCNA por meio de Western blot, entre os camundongos selvagens e heterozigotos;
- Camundongos Cx43^{+/+} apresentam maior expressão da Cx43 após 6 dias da cauterização corneal, detectado por meio de Western blot, em comparação a camundongos Cx43^{+/-};
- Não há diferença da expressão das Cx37 e Cx40 por meio de Western blot em córnea de camundongos Cx43^{+/+} e Cx43^{+/-} após 6 dias da cauterização corneal;

- Através de microscopia eletrônica de transmissão é possível identificar a presença das membranas das células endoteliais e as junções comunicantes, durante o processo de neovascularização.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Differentiated cells and the maintenance of the tissue. In:_____. **Molecular biology of the cell**. 2. ed. New York: Garland, 1989, p.951-1000.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; ROFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, Inc., 1994, 1362p.

ANDRADE, S. P.; MACHADO, R. D. P.; TEIXEIRA, A. S.; BELO, A. V.; TARSO, A. M.; BERALDO, W. T. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. **Microvascular Research**, v. 54, p. 253-261, 1997.

AVANZO, J. L. MESNIL, .M. HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MACKOWICK, I. I. MORI, C. M.; DA SILVA, T. C.; OLORIS, S. C.; GARATE, A. P.; MASSIRONE, S. M. YAMASAKI, H.; DAGLI, M .L. Increased susceptibility to urethane-induced lung tumours in mice with decreased expression of connexin 43. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 10, p 1973-82, 2002.

BALDUCCI, J.; KISIK, B.; GILULA, N. B.; HAND, A.; EGAN, J. F.; VINTZILEOS, A. M. Gap junction formation in human myometrium: a key to preterm labor? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 168, n. 5, p. 1609-1615, 1993.

BEYER, E. C. Gap junctions. **International Review of Cytology**, New York, v.137, p. 1-37, 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. 391-397, 2000.

BEYER, E. C.; PAUL, D. L.; GOODENOUGH, D. A. Connexin family of gap junction proteins. **Journal of Membrane Biology**, v. 116, p. 187-194, 1990.

BEYER, E. C.; PAUL, D. L.; GOODEOUGH, D. A. Connexin 43, a protein from rat heart homologous to gap junction protein from liver. **Journal of Cell Biology**, v. 114, p. 1049-1057, 1989.

BRINK, P. R. Gap junction channel gating and permselectivity their roles in coordinated tissue function. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 23, p. 1041-46, 1996.

BRUZZONE, R.; HAEFLIGER, J. A.; GIMLICH, R. L.; PAUL, D. L. Connexin 40, a component of gap-junction in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. **Molecular Biology of the Cell**, v. 4, p. 7-20, 1993.

CAMERON, S. J.; MALIK, S.; AKAIKE, M.; LERNER, N.; MARMAROSH, N.; YAN, C.; LEE, J. D.; ABE, J. I.; YANG, F. Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinases 1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 18682-18688, 2003.

CHENG, T.; CAO, W.; WEN, R.; STEINBERG, R.H.; LAVAIL, M.M. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Müller cell. **Investigative Ophthalmology of Visual Science**, v. 39, p. 581-91, 1998.

CLARK, R. A.; STONE, R. D.; LEUNG, D. Y. K.; SILVER, I.; HOHN, D. C.; HUNT, T. K. Role of macrophages in wound healing. **Surgical Forum**, v. 27, p. 16-18, 1976.

CLIFF, W. J. Kinetics of wound healing in rabbit ear chambers. A time lapse cinemicroscopic study. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences**, v. 50, p. 79-89, 1965.

CONSEJO CANADIENSE DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES. **Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación**. 2. ed. [s.l.:s.n.], 1998. v. 1. Disponível em <http://www.ccac.ca/english/guides/spanish/SPANTOFC.HTM> Acesso em : 15 maio 2000.

CURSIEFEN, C.; RUMMELT, C.; KÜCHLE, M. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor α , and transforming growth factor β_1 in human corneas with neovascularization. **Cornea**, v. 19, n. 4, p. 526-533, 2000.

CURSIEFEN, C.; SCHÖNHERR, U. Angiogenesis and inhibition of angiogenesis in the eye. **Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde**, v. 210, p. 341-351, 1997.

DAVIES, P. F.; DEPAOLA, N.; POLACEK, D. C. Hemodynamic forces and vascular cell communication. **Atherosclerosis**, v. 134, p. 288, 1997.

DEPAOLA, N.; POLACEK, D. C.; DAVIES, P. F. Hemodynamic regulation of endothelial communication. **American Journal of Hypertension**, v. 12, p. 221, 1999.

DI, W. L.; LACHELIN, G. C.; MCGARRIGLE, H. H. G.; THOMAS, N. S. B.; BECKER, D. L. Oestradiol and oestradiol increase cell to cell communication and connexin 43 protein expression in human myometrium. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 7, p. 671-679, 2001.

DUKES, M. J. S. **Fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984, 799p.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSIG, C. J. G. Os órgão dos sentidos. In:_____.**Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 225-235.

ELFGANG, C.; ECKERT, R.; LICHTENBER-FRATÉ, H.; BUTTERWECK, A.; TRAUB, O.; KLEIN R. A.; HÜLSER D. F.; WILLECKE, K.; Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. **Journal of Cell Biology**, v. 129, p. 805-817, 1995.

ERREDE, M.; BENAGIANO, V.; GIROLAMO, F.; FLACE, P.; BERTOSSI, M.; RONCALI, L.; VIRGINTINO, D. Differential expression of connexin43 in foetal, adult and tumor-associated human brain endothelial cells. **The Histochemical Journal**, v. 34, p. 265-71, 2002.

EVANS, W. H.; MARTIN, P. E. M. Gap junctions: structure and function (Review). **Molecular Membrane Biology**, v. 19, p. 121-136, 2002.

FIGUEROA, X. F.; ISAKSON, B. E.; DULING, B. R. Connexins: gaps in our knowledge of vascular function. **Physiology**, v. 19, p. 277-284, 2004.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 10931-20934, 1992.

FOLKAMN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, n. 1, p. 27-31, 1995.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: inibition and control. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 401, p. 212-227, 1982.

FOLKMAN, J. The vascularization of tumors, **Scientific American**, v. 234, n. 5, p. 58-64, 1976.

FROMER C. H.; KLINTWORTH G. K. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. II – Studies related to the vasoproliferative capability of polymorphonuclear leukocytes and lymphocyte. **American Journal of Pathology**, v. 82, p. 157-170, 1976.

GABRIELS, J. E.; PAUL, D. L. Connexin-43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin 37 and connexin 40 are more uniformly distributed. **Circulation Research**, v. 83, p. 636-643, 1998.

GIRÃO, H.; PEREIRA, P. Phosphorylation os connexin 43 ats as a stimulus for a proteasome-dependent degradation of the protein in lens epithelial cells. **Mollecular Visual**, v. 9, p. 24-30, 2003.

GIRARD, L. J. Corneal surgery. In:_____. **Advantage techniques in ophthalmic microsurgery**. St. Louis: The CV Mosby Company, 1981. v. 2, p. 2-26.

GOODENOUGH, D. A.; GOLIGER, J. A.; PAUL D. L. Connexins, connexons, and intercelular communication. **Annual Review Biochemical**, v. 65, p.475-502, 1996.

GROS, D.; JARRYGUICHARD, T.; TENVELDE, I.; DEMAZIERE, A.; VANKEMPEN, M. J. A.; DAVOUST, J.; BRIAND, J. P.; MOORMAN, A. F. M.; JONGSMA, H. J. Restricted distribution of connexin 40, a gap junctional protein in mammalian heart. **Circulation Research**, v. 74, p. 839-851, 1994.

GUSTAFSSON, F.; MIKKELSEN, H. B.; ARENSBAK, B.; THUNEBERG, L.; NEVE, T. S.; JENSEN, L. J.; HOLSTEIN-RATHLOU, N. H. Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 148, p. 119-139, 2003.

HAEFLIGER, J. A.; MEDA, P. Chronic hypertension alters the expression of Cx43 in cardiovascular muscle cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 431-438, 2000.

HAMADA, J.; CAVANOUGH, P. G.; LOTAN, O.; NOCOLSON, G. Separable growth and migration factors for large-cell lymphoma cells secreted by microvascular endothelium cells derived from target organs for metastasis. **Bristish Journal of Cancer**, v. 66, p. 349-354, 1992.

HÜLSER, D. F.; ECKERT, R.; IRMER, U.; KRISCIUKAITIS, A.; MINDIRMANN, A.; PLEISS, J.; REHKOPT, B.; SHAROUSKAYA, J.; TRAUB, O. Intercelular communication via gap junction channels. **Bioclectochemistry and Bioenergtis**, v. 45, p. 55-65, 1998.

JAIN, R. K.; SCTRILEGER, K.; HÖCKEL, M.; YURAN, F. Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. **Nature medicine**, v. 3, n. 11, p. 1203-1208, 1997.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Histologia básica. In:_____. **Órgão dos sentidos**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 1995. 433p.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v. 14, p. 629-40, 1997.

KILARSKI, W. M.; HONGPAISAN, J.; SEMIK, D.; ROOMANS, G. M. Effect of progesterone and oestradiol on expression of connexin 43 in culture human myometrium cells. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 38, n. 1, p. 3-9, 2000.

KIRSCHNER, S. E. Persistent corneal ulcers. What to do when ulcers won't heal. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Prattice**, v. 20, n. 3, p. 627-642, 1990.

KLINTWORTH, G. H. The cornea-structure and macromolecules in health and disease. A review. **American Journal of Pathology**, v. 89, p. 719-808, 1977.

KLINTWORTH, G. H. The ramster check pouch. An experimental model of corneal vascularization. **American Journal of Pathology**, v. 73, p. 691-710, 1973.

KNIGHTON, D. R.; HUNT, T. K.; SCHEUENSTUHL, H.; HALLIDAY, B. J.; WERB, Z.; BANDA, M. L. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. **Science**, v. 221, p. 1283-1285, 1983.

KNIGHTON, D. R.; THAKRAE, K. K.; HUNT, T. K. Platelet-derived angiogenesis: initiation of healing sequence. **Surgery Forum**, v. 31, p. 226-228, 1980.

KRÜGER, O.; BÉNY J. L.; CHABAUD, F.; TRAUB, O.; THEIS, M.; BRIX, K.; KIRCHHOFF, S.; WILLECKE, K. Altered dye diffusion and upregulation of connexin 37 in mouse aortic endothelium deficient in connexin 40. **Journal of Vascular Research**, v. 39, p. 160-172, 2002.

LARSON, D. M.; WROBLESK, M. J.; AGARWAL, S.; SAGAR, G. D. V.; LALL, B.; WESTPHALE, E. M.; BEYER, E. C. Differential expression of connexin 37 and connexin 43 in vascular endothelial-cell is modulated by growth. **Molecular Biology of the Cell**, v. 6, p. 1736, 1995.

LARSON, D. M.; WROBLESK, M. J.; SAGAR, G. D. V.; WESTPHALE, E. M.; BEYER, E. C. Differential regulation of connexin 43 and connexin 37 in endothelial cells by density, growth, and TGF-beta 1. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 41, p. C405-C415, 1997.

LEIBOVICH, S. J.; POLVERINI, P. J.; SHEPARD, H. M.; WISEMAN, D. M. SHIVELY, V.; NUSEIR, N. Macrophage-induced angiogenesis by tumour necrosis factor- α . **Nature**, v. 329, p. 630-632, 1987.

LI, X.; WANG, X. Application of real-time polymerase chain reaction for the quantitation of interleukin-1B mRNA upregulation in brain ischemic tolerance. **Brain Research Protocols**, v. 5, p. 211-217, 2000.

LIAO, Y.; DAY, K. M.; DAMON, D. N.; DULING, B. R. Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, 9989-9994.

LITTLE, T. L.; BEYER, E. C.; DULING, B. R. Connexin 43 and connexin 40 gap junction proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo. **American Journal Physiological**, v. 268, p. 729-739, 1995.

LUFT, J. H. Improvements in epoxi resin embedding methods. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, p. 409, 1961.

LYE, S. J.; NICHOLSON, B. J.; MASCARENHAS, M.; MACKENZIE, L.; PETROCELLI, T. Increased expression of connexin-43 in the rat myometrium during labor is

associated with an increase in the plasma estrogen: progesterone ratio. **Endocrinology**, v. 132, n. 6, p. 2380-2386, 1993.

MESNIL, M. Connexins and cancer. **Biology of the cell**, v. 94, p. 493-500, 2002.

MUTHUKKARUPPAN, V. R. AUERBACH, R. Angiogenesis in the mouse cornea. **Science**, v. 205, p. 1416-1418, 1979.

NAUS, C. C. G.; HEARN, S.; ZHU, D.; NICHOLSON, B. J. SHIVERS, R. R. Ultrastructural analysis of gap junction in C6 glioma cells transfected with connexin 43 cDNA. **Experimental Cellular Research**, v. 206, p. 72-84, 1993.

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.

NORRBY, K.; JAKOBSSON, A.; SORBO, J. Mast cell secretion and angiogenesis, a quantitative study in rats and mice. **Virchows Archives of Cellular Pathology**, v. 57, n. 4, p. 251-256, 1989.

OGAWA, S. I.; YOSHIDA, S.; ONO, M.; ONOUE, H.; ITO, Y.; ISHIBASHI, T.; INOMATA, H.; KUWANO, M. Induction of macrophage in amatory protein-1a and vascular endothelial growth factos during in amatory neovascularization in the mouse cornea. **Angiogenesis**, v. 3, p. 327-334, 1999.

OOSTHOEK, P. W.; VIRÁGH, S.; LAMERS, W. H.; MOORMAN, A. F. M. Immunohistochemical delineation of the conduction system, II: the atrioventricular node and purkinje fibers. **Circulation Research**, v. 73, p. 4824-91, 1993.

OOSTHOEK, P. W.; VIRÁGH, S.; MAYEN, A. E. M.; VAN KEMPEN, M. L. A.; LAMERS, W. H.; MOORMAN, A. F. M. Immunohistochemical delineation of the conduction system, I: the sinoatrial node. **Circulation Research**, v. 73, p. 473-481, 1993.

ORMEROD, L. D. ABELSON, M. B. KENYON, K. R. Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter discs. **Investigative Ophthalmology of Visual Science**, v. 30, p. 2148-2153, 1989.

OVIEDO-ORTA, E.; ERRINGTON, R. J.; EVANS, W. H. Gap junction intercellular communication during lymphocyte transendothelial migration. **Cell Biology International**, v. 26, n. 3, p. 253-263, 2002.

PEPPER, M. S.; MONTESANO, R.; AOUMARI, A. E.; GROS, D.; ORCI, L.; MEDA, P. Coupling and connexin 43 expression in microvascular and large vessel endothelial cells. **American Journal Physiological**, v. 262, p. 1246-1257, 1992.

PEPPER, M. S.; SPRAY, D. C.; CHANSON, M.; MONTESANO, R.; ORCI, L.; MEDA, P. Junction communication is induced in migrating capillary endothelial cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 109, p. 3027-3038, 1989.

PETROCELLI, T.; LYE, S. Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. **Endocrinology**, v. 133, p. 284-90, 1993.

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.

POLACEK, D.; LAL, R.; VOLIN, M. V.; DAVIES, P. F. Gap junctional communication between vascular cells-induction of connexin 43 messenger-RNA in macro-phage foam cells of atherosclerotic lesion. **American Journal of Pathology**, v. 142, p. 593-606, 1993.

QIU, C.; COUTINHO, P.; STEFANIE, F.; FRANKE, S.; LAW, L.Y.; MARTIN, P.; GREEN, C. R.; BECKER, D. L. Targeting connexin 43 expression accelerates the rate of wound repair. **Current Biology**, v. 13, p. 1697-1703, 2003.

REAUME, A.G.; DE DOUZA, 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.

REED, K. E.; WESTPHALE, E. M.; LARSON, D. M. WANG, H. Z.; VENSTRA, R. D.; BEYER, E. C. Molecular-cloning and functional expression of human connexin 37, an endothelial-cell gap junction protein. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 997-1004, 1993.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671-674, 1997.

ROBBINS, S. L. **Pathologic basic of disease**. 5. ed.; Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. 1400 p.

ROCHELS R. Animal experimental studies on the role of inflammatory mediators in corneal neovascularization. **Documenta Ophthalmologica**, v. 57, p. 215-262, 1984.

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

RUMMERY, N. M.; HILL, C. E. Vascular gap junctions and implications for hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, p. 659-667, 2004.

SAFFITZ, J. E.; YAMADA, K. A. Closing the gap in understanding the regulation of intercellular communication. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 807-809, 2000.

SCHOEFL, G. I. Studies on inflammation. II-Growing capillaries: their structure and permeability. **Virchows Archives of Pathology & Anatomy**, v. 337, p. 97-141, 1963.

SEVERS, N. J.; ROTHERY, S.; RUPONT, E.; COPPEN, S. R.; YEH, H. I.; KO, Y. S.; MATSUSHITA, T.; KABA, R.; HALLIDAY, D. Immunocytochemical analysis of connexin expression in the health and diseased cardiovascular system. **Microscopy Research and Technique**, v. 52, n. 3, 301-322, 2001.

SHAW, J. P.; CHUANG, N.; YEE, H.; SHAMAMIAN, P. Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis in vivo. **Journal of Surgical Research**, v. 109, p. 37-42, 2003.

SIDKY, Y. A.; AUERBACH, R. Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative and sensitive assay of graft-vs-host reaction. **Journal of Experimental Medicine**, v. 141, n. 5, p. 1084-100, 1975.

SLATTER, D. Cornea and sclera. In:_____. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 2. ed. Philadelphia:WB Saunders, 1990. p. 257-303.

SÖHL, G.; WILECKE, K. Gap junctions and the connexin protein family. **Cardiovascular Research**, v. 62, p. 228-32, 2004.

STEINBERG, T. H. Gap junction function. **American Journal of Pathology**, v. 152, p. 851-854, 1998.

SUNDERKOTTER, C.; ROTH, J.; SORG, C. Immuno-histochemical detection of bFGF and TNF- α in the course of inflammatory angiogenesis in the mouse cornea. **American Journal of Pathology**, v. 137, n. 3, p. 511-515, 1990.

TABB, T.; THILANDER, G.; GRAVER, A.; HERTZBERG, E.; GARFIEL, R. An immunochemical and immunocytologic study the increase in myometrial gap junction (and connexin 43) in rats and humans during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 167, n. 2, p. 559-567.

TRAUB, O.; HERTLEIN B.; KASPER, M.; ECKERT, R.; KRISCIUKAITIS, A.; HÜLSER, D.; WILLECKE, K Characterization of the gap junction protein connexin 37 in murine endothelium, respiratory epithelium, and after transfection in human hela cells. **European Journal of Cell Biology**, v. 77, p. 313-322, 1998.

TRAUB, R; HOPP, B.; BOR, Z.; DUX, L.; BECKER, D.L.; KRENACS, T. Regeneration of rabbit cornea following excimer laser photorefractive keratectomy: a study on gap junction, epithelial junctions and epidermal growth factor receptor expression in correlation with cell proliferation. **Experimental Eye Research**, v. 73, p. 291-302, 2001.

TROSKO, J. E.; RUCH, R. J. Cell-cell communication in carcinogenesis. **Frontier Bioscience**. Chicago, v. 5, p. 208-236, 1998.

VAN KEMPEN M. A.; FROMAGET, C.; GROS, D.; MOORMAN, A. F. M.; LAMERS, W. H. Spatial distribution of connexin 43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. **Circulation Research**, v. 68, p. 1638-1651, 1991.

VANRJEN, H. V. M.; VANKEMPEN, M. J. A.; POSTMAS, S.; JONGSMA, H. J.; Tumor necrosis factor alpha alters the expression of connexin 43, connexin 40, and connexin 37 in human umbilical vein endothelial cells. **Cytokine**, v. 10, p. 258-264, 1998.

VEENSTRA, R. D.; WANG, H. Z.; BEBLO, D. A.; CHILTON, M. G.; HARRIS, A. L.; BEYER, E. C. Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance. **Circulation Research**, v. 77, p. 1156-1165, 1995.

VEENSTRA, R. D.; WANG, H. Z.; BEBLO, D. A.; CHILTON, M. G.; HARRIS, A. L.; BEYER, E. C.; BRINK, P. R. Selective of connexin-specific gap junction does not correlate with channel conductance. **Circulation Research**, v. 77, p. 1156-1165, 1995.

WARING, G. O. Corneal structure and pathophysiology. In: LEIBOWITZ, H. **Corneal disorders: clinical diagnosis and management**. Philadelphia: WB Saunders, 1984. p. 3-25.

WILLECKE, H.; EIBERGER, J.; DEGEN, J.; ECKARDT, D.; ROMUALDI, A.; GULDENAGEK, M.; DEUTSCH, U.; SOHL, G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. **Biological Chemistry**, v. 383, p. 725-737, 2002.

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**, v. 11, p. 535-542, 1997.

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

YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V.; MESNIL, M.; TANAKA, T.; ZAIDAN-DAGLI, M. L.; OMORI, V. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. **Life Sciences**, v. 323, p. 151-9, 1999.

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

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

YEH, H. I.; CHANG, H. M.; LU, W. W.; LEE, Y. N.; KO, Y. S.; SEVERS, N. J. Age-related alteration of gap junction distribution and connexin expression in rat aortic endothelium. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 48, n. 10, p. 1377-1389, 2000.

YEH, H. I.; DUPONT, E.; COPPEN, S.; ROTHERY, S.; SEVERS, N. J. Gap junction localization and connexin expression in cytochemically identified endothelial cells of arterial tissue. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 539-550, 1997.