

Dayane Bernardino da Cruz

Expressão de conexinas em células-tronco da  
polpa dentária

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo,  
para a obtenção de Título de  
Mestre em Ciências, na Área  
de Biologia/Genética

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Mingroni

São Paulo  
2016

## RESUMO

Mais de 200 mutações patogênicas já foram descritas no gene que codifica a Cx26 (*GJB2*) que levam à surdez hereditária. A mais frequente destas mutações é a c.35delG. Ela é a principal causa de surdez não sindrômica com padrão de herança autossômico recessivo na população brasileira e em diversas populações do mundo. O genoma humano contém 21 diferentes genes de proteínas da família das conexinas que são expressos em diversos tecidos. Os canais comunicantes e hemicanais formados por conexinas facilitam a passagem de pequenos metabólitos entre as células adjacentes e entre a célula e o meio extracelular, promovendo a homeostasia celular. Este estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos da mutação c.35delG em homozigose no gene *GJB2* em SHEDs sobre a diferenciação celular e sobre a expressão das Cx26 (*GJB2*), Cx30 (*GJB6*), Cx31 (*GJB3*), Cx43 (*GJA1*) e Cx50 (*GJA8*) em SHEDs (*Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*). Para isso, obtivemos linhagens de SHEDs a partir de 3 indivíduos portadores da mutação c.35delG em homozigose e de 3 indivíduos controle, sem a mutação. Nossos resultados indicaram que SHEDs portadoras da mutação apresentam maiores taxas de diferenciação em adipócitos e em osteócitos do que SHEDs de indivíduos controle. Por meio de RT-PCR, RT-PCR quantitativa e citometria de fluxo identificamos a expressão dos genes *GJB2* (Cx26), *GJB6* (Cx30) e *GJA1* (Cx43) e suas respectivas proteínas, tanto em SHEDs dos indivíduos com a mutação como em SHEDs de indivíduos controle. Não há expressão dos genes *GJA8* (Cx50) e *GJB3* (Cx31) e suas respectivas proteínas em SHEDs. Por meio de RT-PCR quantitativa observamos aumento dos níveis de expressão do RNAm de *GJA1* e redução de RNAm de *GJB2* em SHEDs oriundas de pacientes com c.35delG, quando comparadas às de amostras controle. Resultados obtidos por meio de *Western Blotting* mostraram aumento de aproximadamente 50% na expressão da Cx43 corroborando os resultados obtidos por meio de RT-PCR quantitativo. Detectamos que a expressão da Cx26 em células de indivíduos com mutação é 50% menor do que em células de indivíduos controle. Os aumentos observados das taxas de diferenciação em adipócitos e em osteócitos podem estar relacionados ao aumento da expressão da Cx43. Sabe-se que a Cx43 possui importante papel na manutenção de pré-adipócitos durante a fase de expansão clonal na adipogênese. A

Cx43 também está relacionada à sinalização celular nas vias de proliferação e diferenciação durante a osteogênese.

Indivíduos portadores da mutação c.35delG apresentam surdez sem outros fenótipos associados sugerem que ocorra redundância funcional entre as conexinas. Além disso, o aumento da expressão de *GJA1* (Cx43) nas SHEDs oriundas dos indivíduos surdos com a mutação c.35delG falam a favor da existência de um mecanismo de regulação compensatório a ser esclarecido, que aumenta a síntese de Cx43 na redução ou ausência da Cx26 funcional.

## ABSTRACT

More than 200 pathogenic mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) were associated to deafness. The most frequent is the c.35delG mutation, which is the most common cause of nonsyndromic recessive hearing loss in the Brazilian population, and also in several populations in the world. The human genome contains 21 genes that comprise the gene family of the connexins, expressed in many different tissues. Connexins are components of gap junctions and hemichannels, which facilitate the transference of small metabolites between cells and between cells and the extracellular medium. The aim of this study was to investigate the effects of the c.35delG mutation on adipogenesis, chondrogenesis and osteogenesis, and also its effects on mRNA and protein expression related to Cx26 (*GJB2*), Cx30(*GJB6*), Cx31 (*GJB3*), Cx43 (*GJA1*) and Cx50 (*GJA8*) in SHEDs (stem cells from human exfoliated deciduous teeth). For this purpose, 3 SHED lines from patients with c.35delG mutation in homozygosis and 3 lines from individuals without mutation were established. We observed that the rates of induced differentiation into adipocytes and osteocytes were higher in SHEDs from individuals with the c.35delG mutation than in SHEDs from control individuals. By RT-PCR, real time RT-PCR and flow cytometry were detected the expression of *GJB2*, *GJB6* and *GJA1* genes and their respective proteins Cx26, Cx30 and Cx43 in SHEDs from control samples and in SHEDs with the mutation. The expression of *GJA8* (Cx50) and of *GJB3* (Cx31) were not detected in SHEDS from both groups. Quantitative gene expression analysis using real-time RT-PCR revealed significantly elevated levels of *GJA1* mRNA expression and decreased *GJB2* mRNA expression in cells from patients with c.35delG, when compared to cells from normal controls. Western Blotting analysis showed an increase of about of 50% of the protein Cx43 in cells with c.35delG mutation, in comparison to cells from normal controls, in accordance with the real-time RT-PCR results. We detected that Cx26 protein expression in samples with c.35delG mutation is approximately 50% lower than in SHEDs from normal controls. The observed increase in differentiation rates related to adipogenesis and osteogenesis may be explained by the higher levels of Cx43 expression. This is supported by the fact that Cx43 was reported to play an important role in the maintenance of pre-adipocytes during clonal expansion and it was also related to cell signaling pathways in proliferation and differentiation during

osteogenesis. Individuals with c.35delG in homozygosis present only deafness, without other symptoms, which suggests that functional redundancy between connexins may exist. The increase of Cx43 expression in SHEDs from deaf patients with c.35delG mutation found by us may be related to a compensation mechanism to be clarified, which results in increase of the production of Cx43 when functional connexin Cx26 is reduced or absent.

## 1. INTRODUÇÃO

Deficiência ou perda auditiva é a incapacidade total ou parcial de captar as informações sonoras que nos rodeiam. Ela afeta principalmente a capacidade de comunicação dos seres humanos, pois interfere no desenvolvimento da fala, da linguagem e, conseqüentemente, da socialização. A deficiência auditiva é considerada uma das deficiências hereditárias mais comuns. Além dos fatores hereditários, a perda auditiva pode ter origem em fatores ambientais, ou ainda, em uma combinação de ambos.

O termo “surdez” para alguns especialistas implica em um comprometimento auditivo geralmente grave a profundo (Smith e col., 2014), enquanto os termos perda ou deficiência auditiva são comumente usados para se referir a qualquer tipo de dificuldade auditiva independentemente do grau de gravidade do quadro. Neste estudo, utilizaremos os três termos para descrever qualquer déficit ou comprometimento auditivo, independentemente do tipo ou grau.

Resultados do Censo de 2010 (IBGE – Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) indicam que cerca de 5,1% da população total (9,7 milhões de brasileiros) apresentam algum tipo de incapacidade auditiva; destes, cerca de 340 mil não escutam de modo algum, 1,7 milhão apresentam grande dificuldade para ouvir e 7,5 milhões apresentam alguma dificuldade.

Em países desenvolvidos, a taxa de perda auditiva congênita se mantém aproximadamente em um a dois a cada mil nascidos vivos (Morzaria e col., 2004); dentre estes, em aproximadamente 60% dos casos, a deficiência é devida a causas genéticas e, em aproximadamente 40% dos casos, é adquirida devido a causas ambientais (Finstere e Fellingner, 2005). No Brasil, a incidência de perda auditiva grave a profunda foi estimada em cerca de 2,5 a cada mil nascidos vivos (Bevilacqua e col., 2010; Chapchap e col., 2011). Até a década de 1990, a deficiência auditiva hereditária correspondia a 16% dos casos de surdez no país (Braga e col., 1999). No entanto, esse panorama já pode ter sido modificado em virtude de mudanças recentes nas condições de assistência à saúde das populações. Além da fração congênita, muitas crianças irão apresentar deficiência auditiva após o nascimento, mas antes da aquisição da linguagem, e outras apresentarão déficit progressivo até a segunda década de vida ou até mesmo após.

O desenvolvimento do aparelho auditivo e seu funcionamento dependem da ação de vários genes. Segundo a estimativa feita por Finsterer e Fellingner (2005), acredita-se que o funcionamento adequado de cerca de 300 a 500 genes seja necessário à audição, o que torna a surdez geneticamente muito heterogênea. Além disso, a surdez também é clinicamente heterogênea, variando quanto à idade de manifestação, gravidade da perda, frequências atingidas, lado do acometimento, evolução e origem do defeito.

Além de serem classificadas quanto à sua manifestação clínica, as perdas auditivas podem ser classificadas segundo a etiologia. Perdas causadas por agressões ambientais, como exposição excessiva a ruídos, trauma acústico, infecções virais ou bacterianas, e o uso de drogas ototóxicas, são chamadas de perdas ambientais. Já os casos de etiologia genética ocorrem devido a mutações em diferentes genes ou elementos regulatórios gênicos relacionados ao desenvolvimento da estrutura e função da orelha (Dror e Avraham, 2009).

### **1.1 Fisiologia da audição**

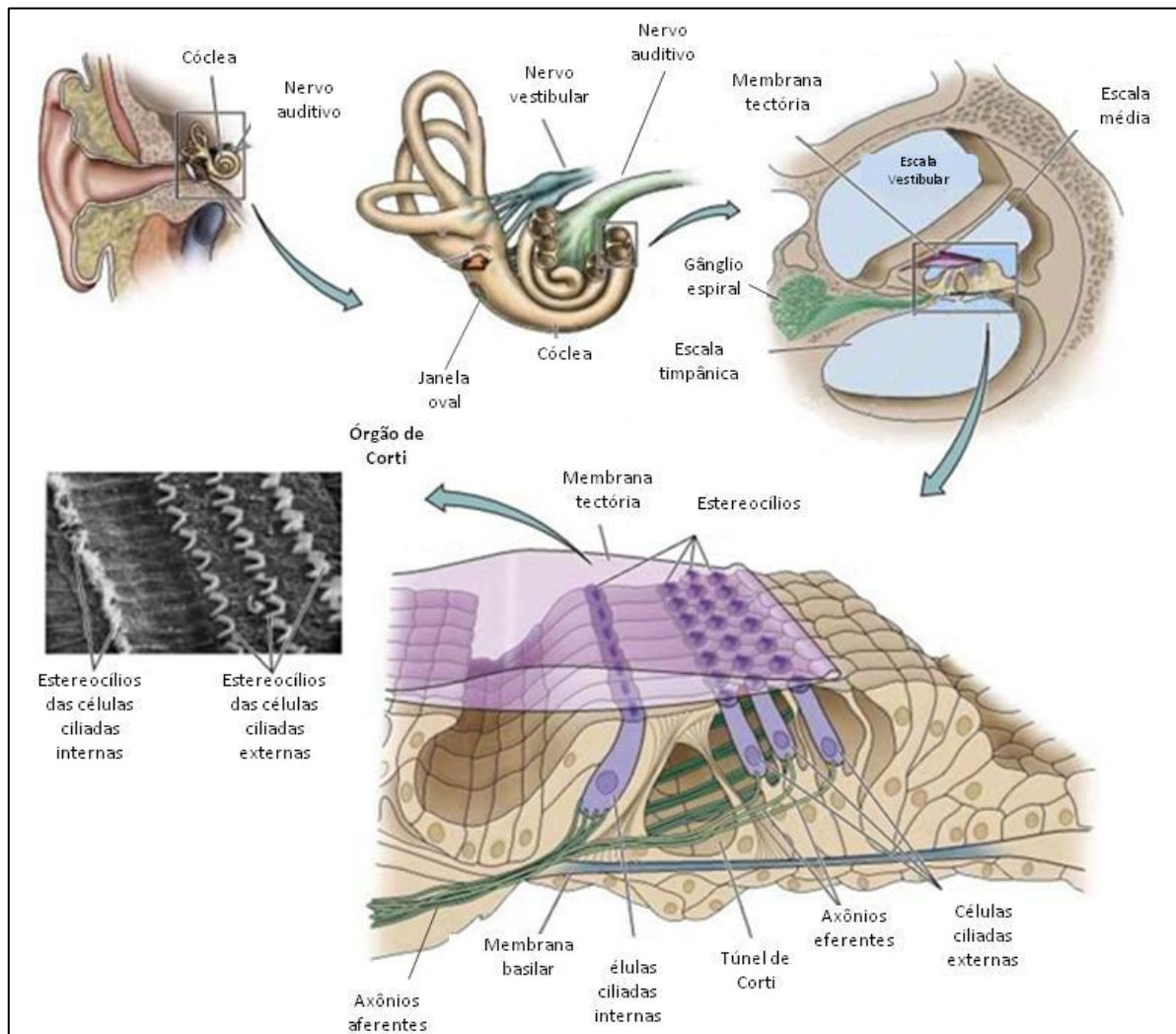
O sistema auditivo transforma as ondas sonoras em padrões distintos de atividade neural para produzir respostas, sendo a orelha o órgão capaz de captar estas ondas sonoras. O aparelho auditivo está dividido em três compartimentos distintos: a orelha externa, orelha média e orelha interna.

O primeiro estágio desta transformação se dá na orelha externa, onde ocorre a captação das ondas sonoras que se chocam com a membrana timpânica, gerando compressão e descompressão alternada do ar, levando a um deslocamento de “vai-e-vem” da membrana. Em seguida, na orelha média, ligado à membrana timpânica, encontra-se o martelo e este, por sua vez, está associado aos outros ossículos, bigorna e estribo, que em conjunto deslocam-se para trás e para frente até finalmente atingir a janela oval e transmitir mecanicamente a onda sonora para a orelha interna. Na orelha média ocorre a amplificação do som, pois os ossículos atuam como alavancas capazes de aumentar a força da vibração mecânica. Na orelha interna está localizada a cóclea. A cóclea é um canal ósseo-membranoso em formato de caracol e é dividido em três compartimentos preenchidos por fluidos: a escala média, a escala vestibular e a escala timpânica (Figura 1).

A escala vestibular e a escala timpânica são preenchidas por fluidos com composição química semelhante à do plasma, com alta concentração de  $\text{Na}^+$  e baixa

concentração de  $K^+$ . A escala média é preenchida pela endolinfa, que é composta por alta concentração de  $K^+$  e baixa de  $Na^+$ . Na escala média está presente o órgão de Corti, que é a porção sensorial propriamente dita do sistema auditivo (Guyton e Hall, 2011).

O órgão de Corti está situado sobre a membrana basilar e é composto por células de suporte e células ciliadas (Figura 1). Estas últimas são as células sensoriais. Elas são classificadas em células ciliadas internas ou externas. A porção apical das células ciliadas possui projeções especializadas, ricas em actina e banhadas pela endolinfa, denominadas estereocílios. Cobrindo esta camada de células ciliadas, encontra-se a membrana tectória. Os estereocílios das células ciliadas externas ficam presos sob a membrana tectória, enquanto os das células ciliadas internas ficam livres na endolinfa.



**Figura 1: Ilustração esquemática da cóclea e sua seção transversal.** Em destaque, esquema detalhado do órgão de Corti. Modificado de "The inner ear", capítulo "The auditory system" do livro "Neuroscience", disponível no NCBI Bookshelf – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=A894>.



Quando a pressão sonora amplificada é passada mecanicamente da orelha média para a orelha interna, fluidos se movem pela escala média e fazem vibrar a membrana basilar. Por consequência, por meio dos estereocílios a membrana tectória também vibra. As vibrações são o gatilho para a deflexão dos estereocílios, e a abertura dos seus canais mecanoativados. Devido à alta concentração de  $K^+$  na endolinfa, ocorre o influxo desses íons, gerando assim, a despolarização da membrana das células ciliadas internas. Esta despolarização provoca a liberação de vesículas contendo neurotransmissores nas sinapses de fibras nervosas localizadas na base das células ciliadas internas e o padrão de potenciais de ação é então conduzido pelo nervo acústico até o cérebro (Guyton e Hall, 2011).

## 1.2 Surdez de etiologia genética

Dentre os casos de deficiência auditiva, foi estimado em países desenvolvidos que a surdez genética corresponde a 60% dos casos, enquanto no Brasil, estimou-se que corresponde a cerca de 16% dos casos de surdez (Braga e col., 1999).

A surdez de etiologia genética é muito heterogênea, ou seja, fenótipos idênticos ou semelhantes decorrem de mutações em muitos locos diferentes e de diferentes mecanismos de herança. Em relação ao mecanismo de herança, a surdez pode ter herança autossômica dominante, autossômica recessiva, mitocondrial ou ligada ao X, dominante ou recessiva. Divide-se ainda em surdez síndrômica, ou seja, quando a surdez apresenta-se associada a outros sinais clínicos; utiliza-se o termo surdez não síndrômica quando a surdez é o único sinal clínico. Apesar de existirem mais de 400 doenças ou síndromes que incluem a surdez como um dos seus sinais clínicos, as formas não-síndrômicas correspondem a 60-70% dos casos de surdez hereditária (Xing e col., 2007). Cerca de 75-80% dos casos de surdez hereditária não síndrômica são de herança autossômica recessiva, 20-25% de herança autossômica dominante e 1 a 1,5% de herança ligada ao X (Smith e col., 2014). A frequência da herança mitocondrial não é bem conhecida, sendo estimada em 1% (Kokotas e col., 2007).

Por exemplo, mutações nos genes *GJB2*, *GJB6*, *MYO7A*, *TECTA* e *TMC1* podem se comportar como dominantes ou recessivas e acarretar formas síndrômicas e não síndrômicas de surdez (Smith e col., 2014).

Os diferentes locos ou regiões candidatas a conterem um ou mais genes responsáveis pelas formas de surdez não-síndrômica são chamados de DFN (do

inglês *DeaFNess*) e numerados de acordo com a ordem de descoberta. Os locos que estão relacionados à surdez de herança autossômica dominante são denominados DFNA, aqueles que estão relacionados à surdez autossômica recessiva são denominados DFNB e os que estão no cromossomo X, DFNX. Há também dois locos modificadores, denominados DFNM1 e DFNM2, e um único loco no cromossomo Y, denominado DFNY. A numeração dos locos é dada cronologicamente, ou seja, a partir da data do seu mapeamento.

A surdez também pode resultar de mecanismo multifatorial, ou seja, decorrer da interação de diversos fatores genéticos com fatores ambientais.

### 1.2.1 Surdez não síndrômica

Apesar da surdez ser muitas vezes associada a outros fenótipos, 70% dos casos de surdez hereditária são não síndrômicos (Keats e Berlin, 1999). As deficiências auditivas de herança autossômica recessiva são responsáveis por 70-80% dos casos hereditários não-síndrômicos, e em sua maioria são caracterizadas como sensorineurais, estacionárias, de grau grave a profundo, de manifestação pré-lingual e geralmente atingem todas as frequências (Keats e Berlin, 1999).

Até o momento já foram identificados 60 genes relacionados à surdez recessiva (Van Camp & Smith, 2016). Entre eles, o gene *GJB2* (loco DFNB1) é o mais importante, por ser relacionado a mais de 50% dos casos de surdez não-síndrômica autossômica recessiva (Gasparini e col., 1997; Bitner-Glindzicz, 2002).

### 1.2.2 Os genes *GJB2* e *GJB6* e a surdez de herança de autossômica recessiva não-síndrômica

O gene *GJB2*, no loco DFNB1 (13q11-12), foi identificado em 1992 por Lee e colaboradores e explica mais de 50% dos casos de surdez não-síndrômica autossômica recessiva (Gasparini e col., 1997; Bitner-Glindzicz, 2002). Já foram descritas mais de 220 mutações patogênicas diferentes no gene *GJB2* (Chang and Chang, 2014) sendo que a maioria delas acarreta surdez pré-lingual com padrão de herança autossômico recessivo (Bitner- Glindzicz 2002; Hilgert et al. 2009; Kenneson e col., 2002).

O gene *GJB2* é pequeno, possui apenas 2 éxons, sendo apenas o segundo codificador da proteína conexina 26 (Cx26). Dentre todas as mutações descritas no gene *GJB2*, a c.35delG é a mutação predominante, presente em até 75% dos casos

de mutações nesse locus em caucasóides (Gasparini e col., 2000; *Connexin deafness homepage*, 2014). A mutação descrita como c.35delG é uma deleção em uma das seis guanosinas repetidas nas posições 30-35, que leva à mudança de matriz de leitura, gerando um códon de parada prematuro do tipo opala (UGA) poucas bases após a deleção. Isso deve resultar na tradução de uma proteína truncada de apenas 12 aminoácidos. É interessante notar que a mutação c.35delG em homozigose resulta em surdez não-sindrômica e parece não afetar outros tecidos. A mutação c.35delG é também muito frequentemente encontrada na população brasileira. Foi identificada em cerca de 12% dos casos de surdez averiguados em serviços de genética (Batissoco e col., 2009; Motta e col., 2012).

Muitas outras mutações neste mesmo gene já foram descritas. A maioria dos alelos descritos até o momento no gene *GJB2* se comportam como recessivos (Kenneson e col., 2002); porém, já foram descritas mutações associadas a um padrão de herança autossômico dominante (DFNA3) e também à surdez sindrômica, geralmente associada a doenças que afetam a pele (Kelsell e col., 1997; Denoyelle e col., 1998; Richard e col., 1998).

No cromossomo 13, em posição adjacente à do gene *GJB2*, existe um gene, também localizado no loco DFNB1, o gene *GJB6*, identificado em 1996 (Dahl e col.). Ele também codifica uma proteína conexina (Cx 30) que possui 77% de identidade na sequência de aminoácidos com a Cx 26 (Pallares-Ruiz e col., 2001). Ao contrário do gene *GJB2*, diferentes estudos identificaram grandes deleções no loco DFNB1, que excluem o gene *GJB6* ou regiões vizinhas a ele, em indivíduos surdos previamente caracterizados como portadores de uma única mutação recessiva no gene *GJB2*. Dentre as deleções já descritas, a del*GJB6* (D13S1830) de 309Kb e a del*GJB6*(D13S1854) de 233Kb descritas por del Castillo e cols., em 2002 e 2005 respectivamente, são as únicas que possuem nome específico. Estudos recentes observaram mutações de ponto no gene *GJB6*, como é o caso da mutação c.263C>T observada em heterozigose em uma família chinesa portadora da síndrome de Clouston, doença com padrão autossômico dominante (Liu e col., 2015). A mutação foi testada em 14 indivíduos normais da família e em 218 indivíduos não aparentados à família e não foi detectada em nenhum dos indivíduos. Esses resultados levaram a acreditar que se trata de uma mutação patogênica responsável pelo fenótipo (Yang e col., 2016). Até o momento apenas três mutações de ponto no gene *GJB6* foram relacionadas a surdez não sindrômica, a c.C14T, a

c.63delG e a c.A607G (*Connexin homepage*, 2016; Battelino e col., 2012). Nestes três casos, não há artigos completos que descrevam a mutação com seus efeitos.

Na cóclea, as conexinas 26 e 30 se co-localizam nas células de suporte do órgão de Corti, na região basal da estria vascular e nos fibrócitos do tipo 1 do ligamento espiral, sendo que nenhuma outra conexina foi encontrada nesses tipos celulares (Forge e col., 2003). Além das conexinas 26 (gene *GJB2*) e 30 (gene *GJB6*), outras conexinas também existem na cóclea, porém em regiões diferentes: são as conexinas 31 (gene *GJB3*) e a conexina 43 (gene *GJA1*) que se expressam apenas no ligamento espiral e no nervo auditivo. Entretanto, somente os genes correspondentes às conexinas 26, 30 e 31 estão associados à surdez de herança autossômica recessiva e/ou dominante (Van Camp e Smith, 2016).

### 1.3 As proteínas conexinas

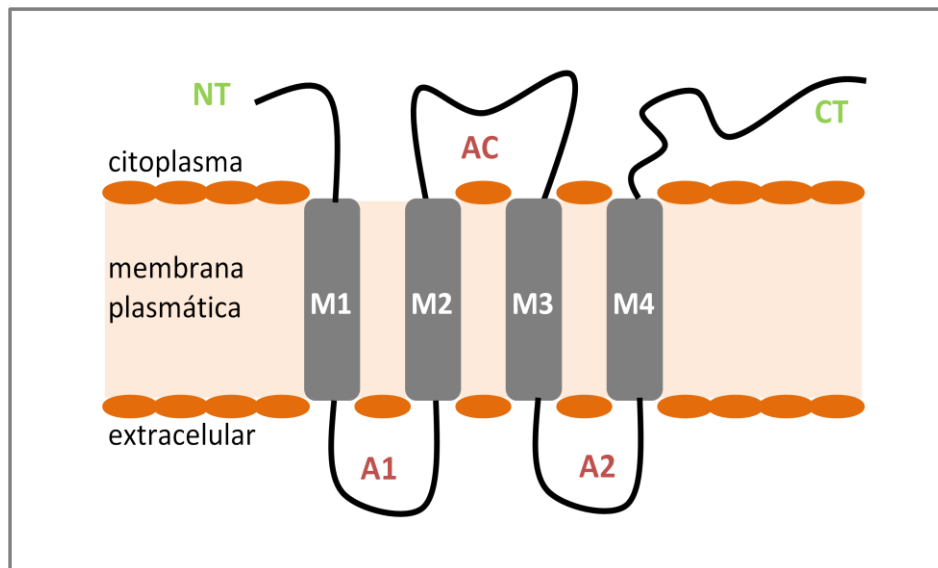
#### 1.3.1 Estrutura

As conexinas constituem uma superfamília de proteínas dividida em cinco subfamílias, alfa, beta, gama, delta e épsilon (Tabela 1), de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos, variando a identidade entre 50 a 80% (*HUGO Gene Nomenclature Committee*, <http://www.genenames.org/genefamilies/GJ>; Chang e col., 2003) sendo os domínios transmembrânicos os mais conservados. Na nomenclatura mais comum para se descrever as conexinas, usa-se “Cx” seguida de sua massa em kilodaltons (kDa).

**Tabela 1: Distribuição das conexinas divididas em cinco subfamílias (*HUGO Gene Nomenclature Committee*) com suas respectivas proteínas.**

Família Alfa	Cx37 ( <i>GJA4</i> ), Cx40 ( <i>GJA5</i> ), Cx43 ( <i>GJA1</i> ), Cx46 ( <i>GJA3</i> ), Cx50 ( <i>GJA8</i> ), Cx59 ( <i>GJA9</i> ), Cx62 ( <i>GJA10</i> )
Família Beta	Cx25 ( <i>GJB7</i> ), Cx26 ( <i>GJB2</i> ), Cx30 ( <i>GJB6</i> ), Cx30.3 ( <i>GJB4</i> ), Cx31 ( <i>GJB3</i> ), Cx31.1 ( <i>GJB5</i> ), Cx 32 ( <i>GJB1</i> )
Família Gama	Cx30.2 ( <i>GJC3</i> ), Cx45 ( <i>GJC1</i> ), Cx47 ( <i>GJC2</i> )
Família Delta	Cx31.9 ( <i>GJD3</i> ), Cx36 ( <i>GJD2</i> ), Cx40.1 ( <i>GJD4</i> )
Família Epsilon	Cx23 ( <i>GJE1</i> )

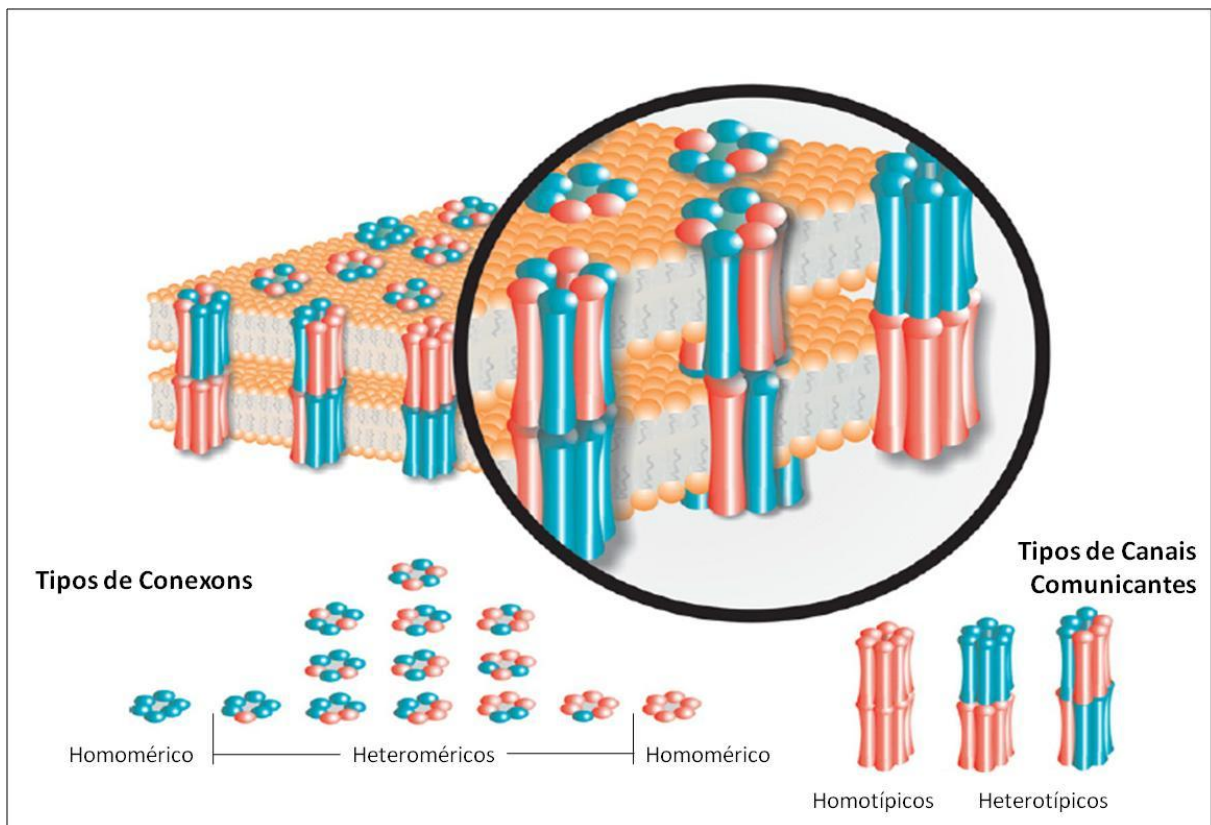
As conexinas possuem uma estrutura em comum, sendo constituídas por quatro domínios transmembrânicos hidrofóbicos, ligados entre si por duas alças extracelulares, uma alça citoplasmática e um grupo amino (N-terminal) e um carboxi-terminal (C-terminal) citoplasmáticos (Bruzzone e col., 1996) (Figura 2). Os dois domínios extracelulares são importantes para a ancoragem que ocorre entre dois conexons de células adjacentes, bem como para a compatibilidade entre eles, pois possuem resíduos de cisteína conservados, que se ligam para formar as pontes dissulfídicas.



**Figura 2: Representação esquemática da estrutura das conexinas.** M1, M2, M3 e M4 representam os seus quatro domínios transmembrânicos; A1 e A2 representam as duas alças extracelulares; AC representa a alça citoplasmática; NT, o domínio N-terminal e CT, o domínio C-terminal.

Seis proteínas conexinas se organizam ao redor de um poro central para formar os hemicanais denominados de conexons. Os conexons, um de cada célula, se alinham no espaço extracelular entre as duas células vizinhas, formando um canal de junção comunicante (*gap junction*). Se o conexon for formado por um único tipo de conexina é chamado de homomérico; se for formado por conexinas diferentes, heteromérico. Do mesmo modo, o canal de junção comunicante é denominado de homotípico se for formado por conexons idênticos e heterotípico, quando os conexons são diferentes (Laird, 2006) (Figura 3). Os diferentes tipos de conexinas que formam os canais comunicantes proporcionam características de permeabilidade únicas, o que é refletido nos tipos de metabólitos e na sinalização celular que fluem através deles, assim como nas propriedades de abertura e fechamento desses canais (*gating*) (Cottrell e Burt, 2005). No entanto, estudos

diferentes já demonstraram que existe incompatibilidade funcional entre determinados tipos de conexinas que formam os conexons e entre os diferentes conexons que formam os canais comunicantes. Por exemplo, a Cx26 (*GJB2*) e a Cx30 (*GJB6*), que pertencem à mesma subfamília beta, são capazes de formar canais homoméricos, heteroméricos, homotípicos e/ou heterotípicos funcionais (Beltramello e col. 2005). Até recentemente não havia evidências sobre a formação de canais comunicantes funcionais entre a Cx26 ou a Cx30 com membros mais distantes da família das conexinas, como a Cx43 e a Cx45, que pertencem à subfamília alfa (Gemel e col. 2004; Nagy e col. 2003). Porém, Shuja e colaboradores demonstraram em 2015 a existência de conexons heteroméricos com Cx26 mutante e a Cx43 selvagem.



**Figura 3: Representação esquemática dos conexons e das junções comunicantes.** Na figura podemos observar a organização dos conexons pela hexamerização das conexinas, que podem ser homoméricas, quando formados pelo mesmo tipo de conexina, ou heteroméricas, se formados por conexinas diferentes; é mostrada a organização dos canais comunicantes, que quando forem formados por dois conexons idênticos são chamados homotípicos e quando forem formados por dois conexons diferentes, são heterotípicos (Modificado de Laird, 2006).

### 1.3.2 Expressão

O genoma humano contém 21 genes diferentes para conexinas, um a menos se comparado ao genoma de camundongo. Na tabela 2 está apresentada a distribuição tecidual da expressão de cada conexina.

**Tabela 2: Distribuição tecidual dos RNAm correspondentes a conexinas em humanos (Cxhs) e em camundongos (Cxmus) (Modificada de Rackauskas e col., 2010).**

Cxhs	Cxmus	Local de Expressão
Cx26	Cx26	cóclea, pele, glândula mamária, glândula salivar, fígado, útero, testículo células da glia, pâncreas, pulmão, estômago, tireóide, paratireóide, cérebro
Cx30	Cx30	cóclea, pele, cérebro, pulmão, útero, cristalino
Cx31.3	Cx29	oligodentrócitos, músculo esquelético, fígado, pâncreas, rins
Cx30.3	Cx30.3	pele, rins, blastocisto
Cx 31	Cx31	pele, cóclea, epitélio das vias aéreas, placenta, blastócito, rins, testículos, olhos
Cx31.1	Cx31.1	pele, testículos
Cx31.9	Cx30.2	coração, cérebro ( <i>M.musculus</i> )
Cx32	Cx32	fígado, pele, células de <i>Schwann</i> , oligodendrócitos, rins, pulmão, baço, cérebro, glândula mamária, pâncreas, glândula salivar, testículos
	Cx33	testículos
Cx36	Cx36	retina, pâncreas, cérebro
Cx37	Cx37	rins, pulmão, pele, endotélio, células musculares cardíacas, ovários endotélio, blastocisto, ovários, útero, pulmão, coração, fibras de
Cx40	Cx40	<i>Purkinje</i>
Cx43	Cx43	34 tecidos e 86 tipos celulares (Laird, 2006)
Cx45	Cx45	células musculares cardíacas, blastocisto, pulmão, pele, coração, cérebro
Cx46	Cx46	pulmão, cristalino, células musculares cardíacas, células de <i>Schwann</i>
Cx47	Cx47	cérebro, oligodendrócitos
Cx50	Cx50	cristalino, células epiteliais da córnea
Cx62	Cx57	retina, oócitos ( <i>M. musculus</i> )

### 1.3.3 Biossíntese

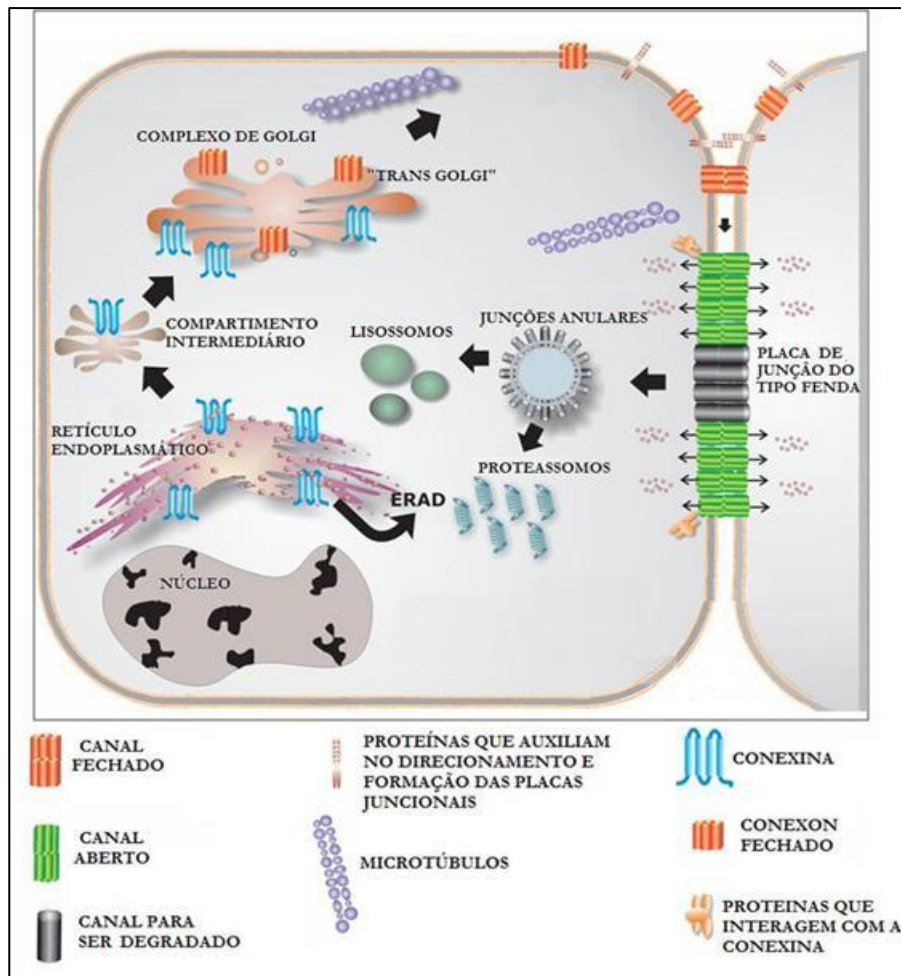
Assim como a maioria das proteínas de membrana, as conexinas são sintetizadas pela via clássica das proteínas secretoras. As conexinas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER) e transportadas à membrana plasmática por meio do complexo de Golgi e vesículas secretoras (Figura 4). Conforme a tradução prossegue, as conexinas adquirem sua estrutura secundária e são integradas às membranas do RE co-traducionalmente (Laird, 2005, 2006 e 2010).

O local da oligomerização das conexinas em conexons não é precisamente definido. Entretanto, acredita-se que seja durante o caminho da via secretora que a maioria das conexinas se oligomerizam para formar os conexons. Cada conexina se hexameriza em pontos diferentes dessa via, dependendo da conexina, mas geralmente isto ocorre entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (Su e col., 2014). Por meio de vesículas transportadoras ou através de extensões tubulares acredita-se que os conexons sejam inseridos na membrana plasmática, onde permanecem como hemicanais até se encontrarem com outro conexon da célula vizinha, ao acaso. Somente após pareados migram juntos até a placa juncional por meio de movimentos laterais na bicamada lipídica da membrana (Koval, 2006; Laird, 2006 e 2009).

As conexinas apresentam meia vida curta, entre uma hora e meia a cinco horas (Su e col., 2014). Desse modo, elas são sintetizadas e degradadas continuamente. Devido à forte interação conexon-conexon na placa juncional, toda a placa, ou parte dela, é internalizada por uma das células adjacentes para ser degradada via lisossômica ou proteossômica dependente de ubiquitina (Viken, 2016).

A maioria dos estudos sobre síntese e tráfego das conexinas foram realizados com a Cx43. Porém, há evidências de que a biossíntese da Cx26 seja diferente da Cx43. A Cx43 é sintetizada no decorrer da via secretora, enquanto a conexina 26 não se mostrou presente na via secretora; acredita-se que ela é sintetizada por alguma via alternativa, pois ela é inserida na membrana após a tradução, diferentemente da Cx43 e Cx32, e o sinal para a regulação do tráfego da Cx26 está no primeiro domínio transmembrânico (Martim e col., 2001). Entretanto, a região N-terminal é necessária para a sinalização e função da junção comunicante, mas não impede que a conexina seja formada (Kyle e col., 2008).





**Figura 4: Ilustração esquemática da síntese, montagem e degradação dos canais comunicantes.** As conexinas são sintetizadas no RE, adquirem sua estrutura secundária no próprio RE ou passam pelo compartimento intermediário e atingem sua topologia final no complexo de Golgi. Os conexons são formados no complexo de Golgi e inseridos na membrana plasmática por vesículas transportadoras ou por extensões tubulares e, finalmente, encontram ao acaso os conexons das células vizinhas formando o canal comunicante e se deslocam até a placa juncional. A degradação dos conexons ocorre através da internalização de toda a placa juncional por uma das células adjacentes que será digerida pela via lisossômica ou proteassômica (Modificado de Laird, 2006).

### 1.3.4 Funções

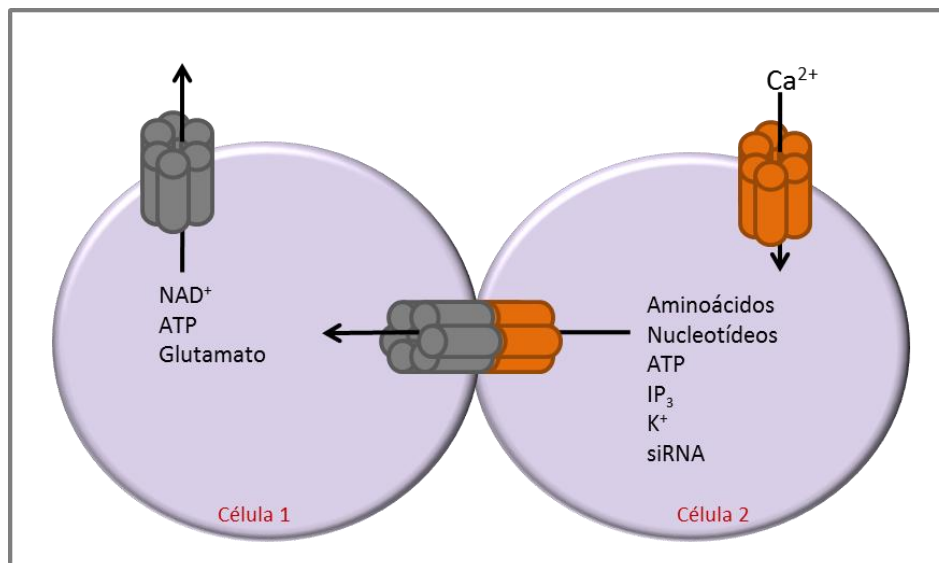
Diferentes tipos celulares expressam diferentes tipos de conexinas, que conseqüentemente formarão diferentes tipos de poros (conexons). Sabe-se que a composição de cada canal comunicante interfere diretamente no tamanho do poro, na sua capacidade e, por conseqüência, em sua função (Oshima e col., 2014).

Os canais formados por conexinas estão relacionados a diversos aspectos do ciclo celular, como por exemplo, a homeostasia, o crescimento e morte celular, o

estabelecimento e manutenção de diferentes tipos celulares, por meio de comunicações intracelulares, intercelulares e extracelulares (Oshima e col., 2014).

Ao nível intracelular, as conexinas que não formaram conexons podem interagir fisicamente com proteínas reguladoras do ciclo celular, como por exemplo, com as ciclinas, e assim afetar seus níveis de expressão que podem levar a alterações nos eventos de crescimento, proliferação/sobrevivência e morte celular (Kar e col., 2012). Em diversos estudos avaliando tumores foi demonstrado que a ausência ou alteração de função e/ou expressão das conexinas afetam diretamente a proliferação de células tumorais (Aasen e col., 2015).

Aos níveis intercelular e extracelular, as conexinas podem formar os canais comunicantes (junções tipo fenda), que possuem como principal função a homeostasia celular por meio de transporte de sais inorgânicos e pequenos metabólitos, menores que 1kDa (Viken e col., 2016) (Figura 5).



**Figura 5: Representação esquemática de canal comunicante do tipo conexon intercelular e extracelular.** Regulação da homeostasia pelos canais comunicantes através do transporte pelos poros de sais inorgânicos e pequenos metabólitos menores que 1kDa.

Na cóclea, uma das funções dos canais comunicantes é regular o transporte dos íons, principalmente os íons potássio na endolinfa. Esses canais fornecem um sistema único de separação, transferência e reciclagem dos íons, sendo responsáveis pela manutenção dos altos níveis de potássio na endolinfa, e, por conseguinte, do seu potencial endococlear, necessário para a transdução de impulsos sonoros em impulsos elétricos que são transmitidos até o cérebro (Kalatzis e Petit, 1998; Pujol e col., 2006).

Em hipóteses preliminares que relacionavam as mutações do gene *GJB2* a disfunções auditivas, era considerado que a alteração da função da conexina 26 acarretaria na interrupção do fluxo de potássio nas células ciliadas e sua concentração elevada na endolinfa, o que resultaria na intoxicação do órgão de Corti por íons potássio. Dessa forma, ocorreria a morte celular e, conseqüentemente, a perda auditiva (Rabionet e col., 2000). No entanto, algumas mutações na conexina 26 que levam à surdez em humanos alteram apenas a permeabilidade de moléculas grandes pelo conexon, como o IP3 (inositol trifosfato), mas mantêm a permeabilidade iônica normal do potássio, como no caso da mutação no gene da Cx26 p.V84L (Ambrosi e col., 2010). Além disso, trabalhos com camundongos nocautes completos e condicionais para o gene *Gjb2* têm demonstrado que a surdez nesses animais ocorre antes do estabelecimento do potencial endococlear e que outras estruturas auditivas já estariam comprometidas antes mesmo do início da morte das células de suporte e células ciliadas (Sun e col., 2009; Wang e col., 2009). Esses trabalhos sugerem que a Cx26 possa ter outras funções no desenvolvimento do órgão de Corti, além da reciclagem dos íons potássio.

Estudos recentes têm atribuído outras funções às conexinas, além da função clássica de formar canais comunicantes. Acreditava-se que os conexons ou hemicanais não pareados com o conexon da célula vizinha permaneciam fechados devido ao alto nível de  $Ca^{+2}$  no meio extracelular; porém, já foi demonstrado que eles são permeáveis à passagem de pequenas moléculas, como ATP (Stout e col., 2004).

Além da função de comunicação celular, as conexinas possuem também importante papel na regulação da morfologia celular estabelecendo polaridade celular, na adesão, na migração e na mobilidade celular. Nota-se que todos esses eventos estão relacionados ao papel exercido pelo citoesqueleto (Matsuuchi e col., 2013). O papel das conexinas na migração e mobilidade celular foi primeiramente observado em células neuronais, onde a migração de células de glioma e neuronal estava relacionada à expressão de conexina 43. Os camundongos nocautes em relação à conexina 43 mostraram diminuição na migração dos neurônios no desenvolvimento do córtex cerebral. Além disso, os canais comunicantes que formam pareamento promovem uma força de adesão entre células adjacentes e interagem por meio do domínio carbóxi-terminal das conexinas com os elementos do citoesqueleto (Elias e col., 2007). O domínio carbóxi-terminal dessas proteínas

também está associado à sinalização celular (Giepmans e col., 2004). Na cauda C-terminal citoplasmática das conexinas existem sítios de interação com diversos tipos de proteínas, entre elas, as proteínas relacionadas a migração e adesão celular. No entanto, detalhes sobre a relação entre as conexinas e eventos de migração e adesão celular ainda são largamente desconhecidos (Kameritsch, 2012).

A comunicação intercelular via canais comunicantes é de fundamental importância durante o desenvolvimento embrionário, pois eles desempenham notável papel relacionado à proliferação e diferenciação celular. Já foi bem demonstrado que a deleção da conexina 26 em homozigose em ratos é letal para o embrião (Gabriel e col., 1998), pois os embriões não conseguem se implantar na parede do útero. Durante o desenvolvimento embrionário humano *in vitro*, são expressos os RNAm de 18 das 20 conexinas conhecidas, exceto os correspondentes a Cx40.1 e a Cx50 (Huettner e col., 2006). Durante os primeiros dias do desenvolvimento as conexinas desempenham relevante função no período de pré-implantação embrionária. Identificou-se alta expressão gênica das Cx30 e Cx43 no estágio de blastocisto humano, e também a expressão gênica das Cx26 e Cx45, porém de forma menos notável (Houghton e col., 2005). Foi visto que canais comunicantes formados pela Cx26, além de estarem presentes nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, voltam a aparecer nos primeiros estágios do desenvolvimento da pele e da cóclea (Kammen-Jolly e col., 2001; Arita e col., 2004; Berthoun e col., 2014).

### **1.3.5 Redundância funcional e compensação entre conexinas**

Somando-se ao fato da família das conexinas ser composta por 21 tipos diferentes de conexinas com alto grau de similaridade, o mesmo tipo de conexina pode ser expresso em diferentes tipos celulares e um mesmo tipo celular pode expressar conexinas diferentes (Tabela 1). Isto nos leva a pensar na possibilidade de redundância funcional por parte destas proteínas e na possibilidade de compensação entre as conexinas no caso de ausência de uma delas. Sabe-se da alta expressão da Cx43 e Cx26 no primeiros estágios do desenvolvimento do cortex, principalmente nos neurônios e nas células da glia. Utilizando-se RNA de interferência Elias e col. (2007) bloquearam a expressão da Cx43 e observaram que não houve efeito sobre a proliferação celular. Observaram também que os defeitos vistos em relação à migração celular eram relativamente brandos.

Sabendo-se que na cóclea de camundongos as Cx26 e Cx30 se co-localizam, Ahmad e col., (2007) demonstraram que a super-expressão da Cx26 compensava os efeitos deletérios na cóclea causados por mutações no gene para a Cx30. Em outro estudo, com camundongo nocaute para a Cx30 como modelo, foi observado que a audição dos camundongos era normal (Boulay e col., 2013). Quando a Cx26 foi mutada, a super-expressão da Cx30 não compensou os efeitos deletérios na cóclea causados pelas mutações no gene da conexina 26 (Lee e col., 2015) e os camundongos eram surdos. Isto indica que a Cx26 parece substituir a Cx30 na cóclea, mas o inverso não é verdadeiro.

Apesar da Cx32 não ser expressa na cóclea, ela se mostrou funcionalmente equivalente à Cx26 em células da cóclea de ratos com o gene da Cx26 nocauteados, quando induzida a sua superexpressão. Foi demonstrado que a superexpressão da Cx32 foi suficiente para compensar a ausência da Cx26 quando foram avaliadas as funções auditivas dos ratos nocauteados (Degen e col., 2011).

A Cx26, além da cóclea, é expressa em outros 13 tecidos (Tabela 2). No entanto, mutações recessivas no gene da Cx26, como por exemplo, a c.35delG, estão associadas apenas à surdez hereditária não síndrômica, não afetando outros tecidos. Isso sugere que nos demais tecidos onde a conexina 26 é expressa, outras conexinas, provavelmente da mesma subfamília, devem compensar sua ausência no estabelecimento dos conexons e/ou dos canais comunicantes. Já nos casos de surdez síndrômica associada ao gene *GJB2*, os sinais clínicos adicionais estão geralmente associados a doenças de pele, como o queratoderma palmoplantar (OMIM, <http://www.omim.org/>).

Tanto nos casos de surdez síndrômica e/ou não síndrômica, associados a mutações no gene da Cx26, os tecidos afetados são sempre de origem ectodérmica, especialmente as células epiteliais. Um dado interessante é que entre os tecidos de origem ectodérmica, a Cx26 é expressa somente na cóclea, na pele e no cérebro (tabela 2) e as doenças associadas a ela se manifestam em dois desses tecidos (o cérebro não é afetado). Já nos demais tecidos onde a Cx26 é expressa, de origem endodérmica ou mesodérmica não encontramos doenças associadas às mutações no gene que a codifica, o *GJB2*. Isso nos leva a indagar se os efeitos das alterações no gene da Cx26 seriam tecido-específicos, compreendendo apenas os tecidos de origem ectodérmica (exceto o cérebro) e talvez a enorme variedade de conexinas

expressas possa suprir a ausência dos conexons compostos por Cx26 nos outros tipos celulares em virtude de redundância funcional.

### 1.3.6 Outras doenças associadas às conexinas

Muito do que conhecemos sobre as conexinas na homeostasia dos diferentes órgãos foi revelado por estudos de mutações em genes que codificam as conexinas humanas, causando a perda de função em uma variedade de doenças. Diferentes conexinas já foram associadas a outras doenças hereditárias, além de surdez. Atualmente, são conhecidas 14 diferentes doenças que são causadas por mutações em um ou mais membros da família das conexinas (Kelly e col., 2014). Dentre as 21 conexinas humanas descritas, apenas 12 tiveram os seus genes associados a doenças humanas (Tabela 3).

**Tabela 3: Seis grupos de doenças relacionadas a mutações nos genes das conexinas**  
(Modificado de Laird , 2014) (na= não avaliado).

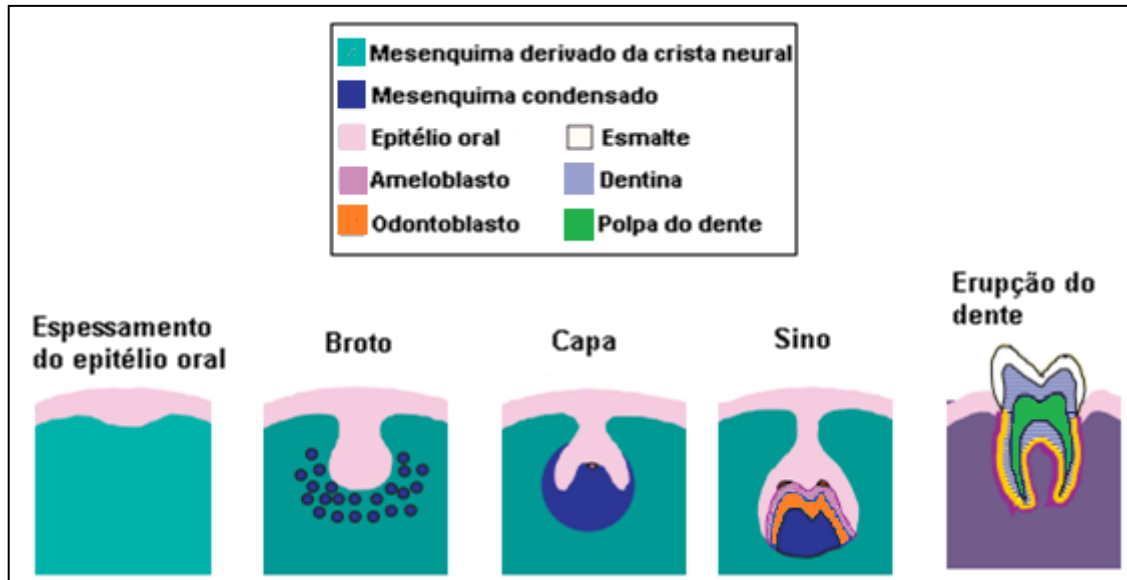
Doenças hereditárias	Proteína (Gene)	OMIM
Surdez Síndrômica e não síndrômica		
Muito comum	<i>GJB2</i> (Cx26); <i>GJB6</i> (Cx30)	121011; 604418
Pouco comum	<i>GJA1</i> (Cx43); <i>GJB3</i> (Cx31); <i>GJB4</i> (Cx30.3)	na;603324; na
Neuropatias ligadas à audição	<i>GJB1</i> (Cx32); <i>GJC3</i> (Cx30.2/Cx29)	304040; 611925
Doenças relacionadas a mielina		
Doença de Charcot-Marie-Tooth	<i>GJB1</i> (Cx32)	304040
Doença de Pelizaeus-Merzbacher	<i>GJC2</i> (Cx47)	608803
Displasias Oculodentodigital e craniometáfiseal	<i>GJA1</i> (Cx43)	121014
Catarata	<i>GJA3</i> (Cx46); <i>GJA8</i> (Cx50)	121015; 600897
Doenças afetando a Pele		
Síndrome de Bart-Pumphrey	<i>GJB2</i> (Cx26); <i>GJB6</i> (Cx30)	121011; na
Síndrome de Clouston	<i>GJB6</i> (Cx30)	604418
Eritroqueratodermia Variabilis	<i>GJB3</i> (Cx31); <i>GJB4</i> (Cx30.3); <i>GJB6</i> (Cx30)	603324; 605425; na
Ictiose com surdez	<i>GJB2</i> (Cx26)	121011
Síndrome KID (queratite, ictiose e surdez)	<i>GJB2</i> (Cx26); <i>GJB6</i> (Cx30)	121011; na
Síndrome de Vohwinkel	<i>GJB2</i> (Cx26); <i>GJB6</i> (Cx30)	121011; na
Doenças Cardiovasculares		
Fibrilação Atrial (FA)	<i>GJA5</i> (Cx40); <i>GJA1</i> (Cx43)	121013; na
Síndrome da morte súbita infantil	<i>GJA1</i> (Cx43)	na

## **1. 4 Células-tronco mesenquimais**

Células-tronco (CT) apresentam prolongada capacidade de auto-renovação, ou seja, se multiplicam mantendo seu estado indiferenciado e capacidade de diferenciação, podendo dar origem a uma variedade de células de diferentes tecidos (Watt e Hogan, 2000). As células-tronco que ocorrem naturalmente são classificadas em CT do adulto e embrionárias. As mais utilizadas em pesquisa, até o momento, são as CT do adulto, devido à menor resistência ética envolvida na sua obtenção. Entre os tipos de CT do adulto, as células-tronco mesenquimais (do inglês, *Mesenchymal Stem Cells* – MSCs) exibem facilidade de isolamento e cultivo, alto potencial de renovação, alto espectro de diferenciação, além da facilidade técnica e ética de obtenção (Kassem, 2004). No ser humano, a principal fonte dessas células é a medula óssea. Porém, devido à dificuldade de obtenção desse tecido (pois é necessário biópsia sob efeito de anestesia), as células mesenquimais têm sido isoladas a partir de diversos outros tecidos, como por exemplo, tecido adiposo, endotélio e subendotélio da veia umbilical, das vilosidades coriônicas, do sangue do cordão umbilical e placentário, do sangue menstrual, da polpa dentária, dentre outros.

### **1.4.1 Células-tronco de polpa dentária**

No início de o desenvolvimento dentário ocorre o espessamento do epitélio oral, formando um broto. O epitélio continua invaginando-se até formar uma capa com mesênquima condensado internamente. A seguir, inicia-se a diferenciação das células do epitélio em esmalte e a interação entre epitélio e mesênquima sinaliza as células do mesênquima condensado a se diferenciar em dentina, ficando a polpa conservada na região interna. Isso ocorre na fase chamada de sino. Por último, ocorre a erupção do dente (Figura 6) (Volponi e col., 2010).



**Figura 6: Representação esquemática dos estágios de desenvolvimento dentário** (Modificada de Volponi e col., 2010).

Gronthos e colaboradores (2002) descreveram pela primeira vez a presença de CT na polpa dentária do terceiro molar dos humanos adultos. Estas células são capazes de se auto-renovar após transplante *in vivo* e se proliferam *in vivo* e *in vitro*. Mais tarde, foi visto que os dentes decíduos humanos também apresentam CT (Miura e col., 2003). Estas são chamadas de SHEDs (do inglês, *stem cell from human exfoliated deciduous teeth*). As SHEDs podem ser isoladas e multiplicadas *in vitro*. São capazes de se diferenciar em linhagens celulares de origem mesenquimal como osteócitos, condrócitos e adipócitos (Dominici e col., 2006), apresentam altas taxas de proliferação (Nakamura e col., 2009), e expressam fatores de transcrição específicos de células indiferenciadas, como *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* (Govindasamy e col., 2010).

### 1.5. A expressão das conexinas em células-tronco

A expressão de diferentes conexinas já foi demonstrada em CT: (i) embrionárias humanas (Carpenter e col., 2004; Wong e col., 2004, 2006; Huettner e col., 2006); (ii) embrionárias de camundongos (Woesdorfer e col., 2008); (iii) mesenquimais humanas da medula óssea (Schichor e col., 2011); células pluripotentes induzidas (*iPS*) (Sharovskaya e col., 2012; Ke e col., 2013) e células progenitoras neurais de camundongos (Imbeault e col., 2009). Os resultados destes estudos estão resumidos na Tabela 4.



**Tabela 4: Expressão gênica e proteica de conexinas.** (+) expressão avaliada e positiva; (-) expressão avaliada e negativa; (na) expressão não avaliada. (Modificado de Rackauskas e col., 2010). A primeira linha se refere ao estudo do RNAm correspondente ao gene da conexina. A segunda linha se refere à expressão da proteína correspondente.

	Embrionária de camundongos (Worsdorfer e col., 2008)	Embrionárias Humanas (Huettner e col., 2008)	Mesenquimais Humanas (medula óssea) (Schichor e col., 2011)	<i>iPS</i> humanas (a partir de fibroblastos) (Ke e col., 2013)	Progenitoras Neurais de camundongos (Imbeault e col., 2009)
<i>GJA1</i>	+	+	+	+	+
Cx43	+	+	+	+	+
<i>GJA3</i>	-	+	-	+	na
Cx46	na	na	na	na	na
<i>GJA4</i>	+	+	na	+	+
Cx37	na	na	na	na	+
<i>GJA5</i>	-	+	na	+	+
Cx40	na	+	na	na	+
<i>GJA8</i>	-	-	+	na	na
Cx50	na	na	na	na	na
<i>GJA9</i>	na	+	na	+	na
Cx59	na	na	na	na	na
<i>GJA10</i>	-	+	na	+	-
Cx62/Cx57 <i>mus</i>	na	na	na	na	na
<i>GJB1</i>	+	+	-	na	+
Cx32	-	na	na	na	-
<i>GJB2</i>	+	+	+	+	+
Cx26	-	na	na	na	+
<i>GJB3</i>	+	+	+	+	na
Cx31	+	na	na	na	na
<i>GJB4</i>	-	+	+	+	na
Cx30.3	na	na	na	na	na
<i>GJB5</i>	-	+	na	na	na
Cx31.1	na	na	na	na	na
<i>GJB6</i>	-	+	na	+	+
Cx30	na	na	na	na	+
<i>GJB7</i>	na	+	na	+	na
Cx25	na	na	na	na	na
<i>GJC1</i>	+	+	-	+	+
Cx45	+	+	na	na	+
<i>GJC2</i>	-	+	-	+	+
Cx47	na	na	na	na	+
<i>GJC3</i>	na	+	+	+	-
Cx30.2	na	na	na	na	na
<i>GJD2</i>	-	+	na	na	+
Cx36	na	na	na	na	-
<i>GJD3</i>	-	+	na	+	-
Cx31.9/ Cx30.2 <i>mus</i>	na	na	na	na	na
<i>GJD4</i>	na	-	na	na	na
Cx40.1	na	na	na	na	na

As conexinas 43 e 45 são as proteínas de maior expressão nas células-tronco (Assou e col., 2007; Liu e col., 2012). Estudos *in vitro* com CT embrionárias de camundongos nocautes em relação aos genes que codificam as conexinas 43 ou 45 evidenciaram redução da proliferação celular e da expressão de marcadores relacionados à pluripotência, como Oct4, Sox2 e Nanog (Ke e col., 2013). Além disso, também já foi demonstrado que o bloqueio das junções comunicantes ou dos hemicanais por meio de agentes químicos inibe a proliferação celular. Estes estudos *in vitro* foram realizados com células-tronco embrionárias humanas e de camundongos, *iPS* humanas e progenitoras neurais de camundongos (Huettner e col., 2006; Worsdorfer e col., 2008; Ke col., 2013; Imbeault e col., 2009). Em todos esses estudos, os autores sugerem que as conexinas estão relacionadas de algum modo com o controle ou manutenção da pluripotência, da proliferação e da diferenciação celular.

### **1.6 Diferenciação de células-tronco mesenquimais em células da cóclea**

O desenvolvimento da cóclea começa a partir da invaginação de um espessamento ectodérmico no placóide ótico, formando uma vesícula chamada otocisto (Morsli e col., 1998). As células multipotentes presentes no otocisto seguem então três linhagens celulares diferentes: (i) linhagem prosensorial, que dá origem às células ciliadas e de suporte; (ii) linhagem proneural, que forma os neurônios auditivos e vestibulares; e (iii) linhagem não-sensorial, responsável pelas células com funções estrutural, secretora e/ou de absorção (Driver e col., 2009).

Diversos protocolos em diferentes tipos de células-tronco foram estabelecidos com o objetivo de obter de células ciliadas da orelha interna e neurônios auditivos. As células-tronco embrionárias humanas (do inglês, *Human Embryonic Stem Cells* - hESC); são capazes de se diferenciar tanto em células ciliadas quanto em neurônios auditivos *in vitro* e *in vivo* (Chen e col., 2012). Neurônios auditivos e células ciliadas também foram obtidos por meio de diferenciação de células-tronco humanas pluripotentes induzidas (do inglês *Human Induced Pluripotent Stem Cells* - hiPSC). Ainda foi visto que *in vivo* os neurônios auditivos mostraram-se capazes de criar sinapses, em co-cultura, com as células ciliadas de explantes de cócleas de camundongos (Gunewardene e col., 2014).

Em relação as células-tronco mesenquimais (MSCs), o primeiro experimento capaz de obter células progenitoras de células ciliadas ocorreu em 2007 (Jeon e

col., 2007). MSCs obtidas da medula óssea de camundongos foram inicialmente diferenciadas em progenitores neurais. Em seguida, utilizando-se 2 protocolos diferentes a partir das progenitoras neurais, os autores obtiveram as células ciliadas e células de suporte em cultura.

Diferentes grupos também obtiveram células ciliadas a partir de MSCs de medula óssea (Qin e col., 2011; Lee e col., 2012) utilizando basicamente combinações do fatores EGF e IGF-1 e outros suplementos específicos, em concentrações diferentes. Sempre obtiveram progenitoras neurais e progenitoras de células ciliadas como intermediárias, com eficiências entre 3 a 4% das células utilizadas, que foram capazes de diferenciar.

Células ciliadas foram obtidas também a partir de MSCs de tecido adiposo de camundongo (Lin e col., 2012) por meio de transfecção com adenovírus expressando o gene *Atoh1* em construção com fusão a EGFP. Após duas semanas, foi observado que todas as células marcadas com EGFP expressavam o marcador de células ciliadas, miosina VIIa. O grupo de Lin foi o primeiro a obter células ciliadas sem passar por etapas intermediárias, onde geralmente eram obtidas células progenitoras neurais.

Embora os experimentos sobre diferenciação de CT em células especializadas em transmissão neurosensorial de forma integrada ao órgão de Corti frustrem em parte a esperança dos autores em contribuir para o desenvolvimento de terapias (Lin e col., 2012), as células-tronco são ferramentas valiosas para se estudar o efeito molecular de diversas mutações que causam doença, especialmente em tecidos de difícil acesso, como é o caso da cóclea, na tentativa de recapitular eventos celulares que ocorreram durante o desenvolvimento.

## 2. CONCLUSÕES

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da mutação c.35delG em homozigose no gene *GJB2* em células-tronco da polpa dentária (SHEDs) sobre a diferenciação celular em adipócitos, condrócitos e osteócitos e sobre a expressão do RNAm e das proteínas conexinas Cx26, Cx30, Cx31, Cx43 e Cx50, por meio da comparação entre células de indivíduos com a mutação com as de indivíduos sem mutação.

Nossos resultados demonstraram alterações nos padrões de diferenciação celular das SHEDs com a mutação quando comparadas aos padrões de diferenciação de SHEDs de indivíduos sem mutação. As SHEDs com mutação apresentaram maiores taxas de diferenciação adipogênica ( $P=0,048$ ) e osteogênica ( $P=0,044$ ) e menor taxa de diferenciação condrogênica, quando comparadas às SHEDs de amostras controle, a um nível de significância de 95%.

Os estudos de expressão revelaram, por meio de RT-PCR, RT-PCR quantitativa e citometria de fluxo, a expressão dos transcritos dos genes *GJB2* (Cx26), *GJB6* (Cx30) e *GJA1* (Cx43) e de suas respectivas proteínas, tanto em SHEDs dos indivíduos com mutação como em SHEDs controle. Entretanto, não há expressão de RNAm e nem das correspondentes proteínas dos genes *GJA8* (Cx50) e *GJB3* (Cx31) nas SHEDs com mutação, nem nas controle. Esses dados são inéditos na literatura.

Em relação aos efeitos da mutação c.35delG em homozigose no gene *GJB2*, observamos por meio de RT-PCR quantitativa que a expressão do RNAm do gene *GJB2* (Cx26) é reduzida, enquanto a expressão do gene *GJA1* (Cx43) é aumentada em SHEDs com a mutação, quando comparadas às SHEDs sem a mutação ( $P=0,007$  e  $P=0,041$ , respectivamente). Utilizando-se a densitometria das bandas obtidas por experimentos de WB, realizamos análise semi-quantitativa da expressão de Cx26 e de Cx43. Observamos que expressão da Cx26 foi aproximadamente 50% menor, enquanto que a da Cx43 foi aproximadamente 50% maior nas amostras de indivíduos portadores da mutação quando comparadas à amostras controle.

As alterações nos padrões de diferenciação celular observadas na adipogênese e osteogênese das células com mutação podem estar relacionadas ao aumento da expressão da Cx43. Na literatura, já foi descrito o importante papel desempenhado pela Cx43 na manutenção de pré-adipócitos durante a fase de

expansão clonal da adipogênese. Além disso, a Cx43 também foi relacionada à sinalização celular nas vias de proliferação e diferenciação durante a osteogênese.

O fato dos indivíduos com a mutação c.35delG só apresentam surdez sem outros fenótipos associados a favor de redundância funcional entre as conexinas, ou seja, a falta da Cx26 poderia ser suprida por outras proteínas, provavelmente da própria família das conexinas em vários tecidos, exceto na cóclea.

As alterações de expressão de *GJA1* (Cx43) nas SHEDs oriundas dos indivíduos surdos com a mutação c.35delG nos sugerem que a Cx43 possa ter um efeito compensatório na ausência da Cx26. Assim, o aumento de expressão de *GJA1* (Cx43) detectado no nosso trabalho é forte evidências a favor não somente da idéia de redundância funcional entre as conexinas, como também a favor da existência de algum mecanismo regulatório compensatório que aumenta a síntese da Cx43 na redução da Cx26.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasen, T. (2015). Connexins: junctional and non-junctional modulators of proliferation. *Cell and tissue research*, 360(3), 685-699.
- Aghajani, F., Hooshmand, T., Khanmohammadi, M., Khanjani, S., Edalatkhah, H., Zarnani, A. H., & Kazemnejad, S. (2016). Comparative Immunophenotypic Characteristics, Proliferative Features, and Osteogenic Differentiation of Stem Cells Isolated from Human Permanent and Deciduous Teeth with Bone Marrow. *Molecular biotechnology*, 58(6), 415-427.
- Ahmad, S., Tang, W., Chang, Q., Qu, Y., Hibshman, J., Li, Y., ... & Lin, X. (2007). Restoration of connexin26 protein level in the cochlea completely rescues hearing in a mouse model of human connexin30-linked deafness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), 1337-1341.
- Ambrosi, C., Boassa, D., Pranskevich, J., Smock, A., Oshima, A., Xu, J., ... & Sosinsky, G. E. (2010). Analysis of four connexin26 mutant gap junctions and hemichannels reveals variations in hexamer stability. *Biophysical journal*, 98(9), 1809-1819
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D. A., Ghosh, S., & Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, 432(7013), 112-118.
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D. A., Ghosh, S., & Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, 432(7013), 112-118.
- Arita, K., Akiyama, M., Tsuji, Y., McMillan, J. R., Eady, R. A. J., & Shimizu, H. (2004). Gap junction development in the human fetal hair follicle and bulge region. *British Journal of Dermatology*, 150(3), 429-434.
- Assou, S., Le Carrou, T., Tondeur, S., Ström, S., Gabelle, A., Marty, S., ... & Gasca, S. (2007). A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas. *Stem Cells*, 25(4), 961-973.
- Batissoco, A. C., Abreu-Silva, R. S., Braga, M. C. C., Lezirovitz, K., Della-Rosa, V., Alfredo Jr, T., ... & Mingroni-Netto, R. C. (2009). Prevalence of GJB2 (connexin-26) and GJB6 (connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. *Ear and hearing*, 30(1), 1-7.
- Battelino, S., Lampret, B. R., Žargi, M., & Podkrajšek, K. T. (2012). Novel connexin 30 and connexin 26 mutational spectrum in patients with progressive sensorineural hearing loss. *The Journal of Laryngology & Otology*, 126(08), 763-769.
- Bedner, P., Steinhäuser, C., & Theis, M. (2012). Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(8), 1971-1984.

- Beltramello, M., Piazza, V., Bukauskas, F. F., Pozzan, T., & Mammano, F. (2005). Impaired permeability to Ins (1, 4, 5) P3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nature cell biology*, 7(1), 63-69.
- Berthoud, V. M., Minogue, P. J., Osmolak, P., Snabb, J. I., & Beyer, E. C. (2014). Roles and regulation of lens epithelial cell connexins. *FEBS letters*, 588(8), 1297-1303.
- Bevilacqua, M. C., de Freitas Alvarenga, K., Costa, O. A., & Moret, A. L. M. (2010). The universal newborn hearing screening in Brazil: from identification to intervention. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 74(5), 510-515.
- Bitner-Glindzicz, M. (2002). Hereditary deafness and phenotyping in humans. *British medical bulletin*, 63(1), 73-94..
- Bivi, N., Lezcano, V., Romanello, M., Bellido, T., & Plotkin, L. I. (2011). Connexin43 interacts with  $\beta$ arrestin: A pre-requisite for osteoblast survival induced by parathyroid hormone. *Journal of cellular biochemistry*, 112(10), 2920-2930.
- Plotkin, L. I., Manolagas, S. C., & Bellido, T. (2002). Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8648-8657.
- Boulay, A. C., del Castillo, F. J., Giraudet, F., Hamard, G., Giaume, C., Petit, C., ... & Cohen-Salmon, M. (2013). Hearing is normal without connexin30. *The Journal of Neuroscience*, 33(2), 430-434.
- Braga M. C. C., Otto P. A., Spinelli M. (1999). Recurrence risks in cases of nonsyndromic deafness. *Braz J Dys and Speech-ear Dis*. 2:33-40.
- Bruzzone, R., White, T. W., & Paul, D. L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. In *Ejb Reviews 1996* (pp. 135-161). Springer Berlin Heidelberg.
- Carpenter, M. K., Rosler, E. S., Fisk, G. J., Brandenberger, R., Ares, X., Miura, T., ... & Rao, M. S. (2004). Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Developmental Dynamics*, 229(2), 243-258.
- Chang, E. H., Van Camp, G., & Smith, R. J. (2003). The role of connexins in human disease. *Ear and hearing*, 24(4), 314-323.
- Chapchap, M. J., & Segre, C. M. (2001). Universal newborn hearing screening and transient evoked otoacoustic emission: new concepts in Brazil. *Scandinavian Audiology*, 30(2), 33-36.
- Chen, W., Johnson, S. L., Marcotti, W., Andrews, P. W., Moore, H. D., & Rivolta, M. N. (2009). Human fetal auditory stem cells can be expanded in vitro and differentiate into functional auditory neurons and hair cell-like cells. *Stem Cells*, 27(5), 1196-1204.
- Cheng, B., Kato, Y., Zhao, S., Luo, J., Sprague, E., Bonewald, L. F., & Jiang, J. X. (2001). PGE2 is essential for gap junction-mediated intercellular communication between osteocyte-like MLO-Y4 cells in response to mechanical strain. *Endocrinology*, 142(8), 3464-3473.

- Civitelli, R., Ziambaras, K., Warlow, P. M., Lecanda, F., Nelson, T., Harley, J., ... & Steinberg, T. H. (1998). Regulation of connexin43 expression and function by prostaglandin E2 (PGE2) and parathyroid hormone (PTH) in osteoblastic cells. *Journal of cellular biochemistry*, 68(1), 8-21.
- Connexin deafness homepage*: <http://davinci.crg.es/deafness/> (2014).
- Cottrell, G. T., & Burt, J. M. (2005). Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1711(2), 126-141.
- Dahl, E., Manthey, D., Chen, Y., Schwarz, H. J., Chang, Y. S., Lalley, P. A., ... & Willecke, K. (1996). Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 17903-17910.
- Dahl, H. H., Saunders, K., Kelly, T. M., Osborn, A. H., Wilcox, S., Cone-Wesson, B., ... & Dennehy, S. (2001). Prevalence and nature of connexin 26 mutations in children with non-syndromic deafness. *The Medical journal of Australia*, 175(4), 191-194.
- Degen, J., Schütz, M., Dicke, N., Strenzke, N., Jokwitz, M., Moser, T., & Willecke, K. (2011). Connexin32 can restore hearing in connexin26 deficient mice. *European journal of cell biology*, 90(10), 817-824.
- del Castillo, F. J., Rodriguez-Ballesteros, M., Alvarez, A., Hutchin, T., Leonardi, E., De Oliveira, C. A., ... & Pandya, A. (2005). A novel deletion involving the connexin-30 gene, del (GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *Journal of medical genetics*, 42(7), 588-594.
- del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M. A., del Castillo, F. J., Álvarez, A., Tellería, D., ... & Moreno, F. (2002). A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *New England Journal of Medicine*, 346(4), 243-249.
- Denoyelle, F., Weil, D., Maw, M. A., Wilcox, S. A., Lench, N. J., Allen-Powell, D. R., ... & Dodé, C. (1997). Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Human molecular genetics*, 6(12), 2173-2177.
- Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular *Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Driver, E. C., & Kelley, M. W. (2009). Specification of cell fate in the mammalian cochlea. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 87(3), 212-221.



- Dror, A. A., & Avraham, K. B. (2009). Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annual review of genetics*, 43, 411-437.
- Elias, L. A., & Kriegstein, A. R. (2008). Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends in neurosciences*, 31(5), 243-250.
- Elias, L. A., Wang, D. D., & Kriegstein, A. R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*, 448(7156), 901-907.
- Finsterer, J., & Fellingner, J. (2005). Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 69(5), 621-647.
- Forge, A., Becker, D., Casalotti, S., Edwards, J., Marziano, N., & Nevill, G. (2003). Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assessment of connexin composition in mammals. *Journal of Comparative Neurology*, 467(2), 207-231.
- Gabriel, H. D., Jung, D., Bützler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E., & Willecke, K. (1998). Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *The Journal of cell biology*, 140(6), 1453-1461.
- Gago-Fuentes, R., Carpintero-Fernandez, P., Goldring, M. B., Brink, P. R., Mayan, M. D., & Blanco, F. J. (2014). Biochemical evidence for gap junctions and Cx43 expression in immortalized human chondrocyte cell line: a potential model in the study of cell communication in human chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(4), 586-590.
- Gasparini, P., Estivill, X., Volpini, V., Totaro, A., Castellvi-Bel, S., Govea, N., ... & Stanziale, P. (1996). Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. *European journal of human genetics: EJHG*, 5(2), 83-88.
- Gasparini, P., Rabionet, R., Barbujani, G., Melchionda, S., Petersen, M., Brøndum-Nielsen, K., ... & Zelante, L. (2000). High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *European Journal of Human Genetics*, 8(1).
- Gemel, J., Valiunas, V., Brink, P. R., & Beyer, E. C. (2004). Connexin43 and connexin26 form gap junctions, but not heteromeric channels in co-expressing cells. *Journal of cell science*, 117(12), 2469-2480.
- Giepmans, B. N. (2004). Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovascular research*, 62(2), 233-245.
- Govindasamy, V., Abdullah, A. N., Ronald, V. S., Musa, S., Aziz, Z. A. C. A., Zain, R. B., ... & Kasim, N. H. A. (2010). Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *Journal of endodontics*, 36(9), 1504-1515.

- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., ... & Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research*, 81(8), 531-535.
- Gunewardene, N., Dottori, M., & Nayagam, B. A. (2012). The convergence of cochlear implantation with induced pluripotent stem cell therapy. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(3), 741-754.
- Guyton, A. C., Hall, J. E. A. C., John, E., Guyton, A. C., Guyton, A. C., Guyton, A. C., ... & González Trigueros, L. (2011). *Tratado de fisiología médica* (No. 612: 616). Elsevier,.
- Hilgert, N., Smith, R. J., & Van Camp, G. (2009). Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics?. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(2), 189-196.
- Holbrook, J. A., Neu-Yilik, G., Hentze, M. W., & Kulozik, A. E. (2004). Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nature genetics*, 36(8), 801-808.
- Houghton, F. D. (2005). Role of gap junctions during early embryo development. *Reproduction*, 129(2), 129-135.
- Huettner, J. E., Lu, A., Qu, Y., Wu, Y., Kim, M., & McDonald, J. W. (2006). Gap junctions and connexon hemichannels in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24(7), 1654-1667.
- Huettner, J. E., Lu, A., Qu, Y., Wu, Y., Kim, M., & McDonald, J. W. (2006). Gap junctions and connexon hemichannels in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24(7), 1654-1667.
- IBGE. Censo Populacional 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (29 de outubro de 2010).
- Imbeault, S., Gauvin, L. G., Toeg, H. D., Pettit, A., Sorbara, C. D., Migahed, L., ... & Simon, A. M. (2009). The extracellular matrix controls gap junction protein expression and function in postnatal hippocampal neural progenitor cells. *BMC neuroscience*, 10(1), 1.
- Jeon, S. J., Oshima, K., Heller, S., & Edge, A. S. (2007). Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 34(1), 59-68.
- Kalatzis, V., & Petit, C. (1998). The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Human molecular genetics*, 7(10), 1589-1597.
- Kameritsch, P., Pogoda, K., & Pohl, U. (2012). Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(8), 1993-2001.
- Kammen-Jolly, K., Ichiki, H., Scholtz, A. W., Gsenger, M., Kreczy, A., & Schrott-Fischer, A. (2001). Connexin 26 in human fetal development of the inner ear. *Hearing research*, 160(1), 15-21.

- Kar, R., Batra, N., Riquelme, M. A., & Jiang, J. X. (2012). Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Archives of biochemistry and biophysics*, 524(1), 2-15.
- Kassem, M. (2004). Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning and stem cells*, 6(4), 369-374.
- Ke, Q., Li, L., Cai, B., Liu, C., Yang, Y., Gao, Y., ... & Harris, A. L. (2013). Connexin 43 is involved in the generation of human-induced pluripotent stem cells. *Human molecular genetics*, 22(11), 2221-2233.
- Keats, B. J., & Berlin, C. I. (1999). Genomics and hearing impairment. *Genome research*, 9(1), 7-16.
- Kelly, J. J., Simek, J., & Laird, D. W. (2015). Mechanisms linking connexin mutations to human diseases. *Cell and tissue research*, 360(3), 701-721.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., ... & Leigh, I. M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387(6628), 80-83.
- Kenneson, A., Braun, K. V. N., & Boyle, C. (2002). GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genetics in Medicine*, 4(4), 258-274.
- Kokotas, H., Petersen, M. B., & Willems, P. J. (2007). Mitochondrial deafness. *Clinical genetics*, 71(5), 379-391.
- Koval, M. (2006). Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends in cell biology*, 16(3), 159-166.
- Koyama, N., Okubo, Y., Nakao, K., & Bessho, K. (2009). Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 67(3), 501-506.
- Kyle, J. W., Minogue, P. J., Thomas, B. C., Domowicz, D. A. L., Berthoud, V. M., Hanck, D. A., & Beyer, E. C. (2008). An intact connexin N-terminus is required for function but not gap junction formation. *Journal of cell science*, 121(16), 2744-2750
- Laird, D. W. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1711(2), 172-182.
- Laird, D. W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochemical Journal*, 394(3), 527-543.
- Laird, D. W. (2010). The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends in cell biology*, 20(2), 92-101.
- Laird, D. W. (2014). Syndromic and non-syndromic disease-linked Cx43 mutations. *FEBS letters*, 588(8), 1339-1348.

- Lee, J. H., Kang, W. K., Seo, J. H., Choi, M. Y., Lee, Y. H., Kim, H. M., & Park, K. H. (2012). Neural Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Applicability for Inner Ear Therapy. *Korean Journal of Audiology*, 16(2), 47-53.
- Lee, M. Y., Takada, T., Takada, Y., Kappy, M. D., Beyer, L. A., Swiderski, D. L., ... & Raphael, Y. (2015). Mice with conditional deletion of Cx26 exhibit no vestibular phenotype despite secondary loss of Cx30 in the vestibular end organs. *Hearing research*, 328, 102-112.
- Lilly, E., Sellitto, C., Milstone, L. M., & White, T. W. (2016, February). Connexin channels in congenital skin disorders. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 50, pp. 4-12). Academic Press.
- Lin, Z., Perez, P., Sun, Z., Liu, J. J., Shin, J. H., Hyrc, K. L., ... & Bao, J. (2012). Reprogramming of single-cell derived mesenchymal stem cells into hair cell-like cells. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 33(9), 1648.
- Liu, X. Z., Xia, X. J., Xu, L. R., Pandya, A., Liang, C. Y., Blanton, S. H., ... & Nance, W. E. (2000). Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Human molecular genetics*, 9(1), 63-67.
- Liu, Y. T., Guo, K., Li, J., Liu, Y., Zeng, W. H., & Geng, S. M. (2015). Novel mutations in GJB6 and GJB2 in Clouston syndrome. *Clinical and experimental dermatology*, 40(7), 770-773.
- Liu, Y. T., Guo, K., Li, J., Liu, Y., Zeng, W. H., & Geng, S. M. (2015). Novel mutations in GJB6 and GJB2 in Clouston syndrome. *Clinical and experimental dermatology*, 40(7), 770-773.
- MacArthur, D. G., Balasubramanian, S., Frankish, A., Huang, N., Morris, J., Walter, K., ... & Albers, C. A. (2012). A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science*, 335(6070), 823-828.
- Martin, P. E., Blundell, G., Ahmad, S., Errington, R. J., & Evans, W. H. (2001). Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *Journal of cell science*, 114(21), 3845-3855.
- Matsuuchi, L., & Naus, C. C. (2013). Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(1), 94-108.
- Merrifield, P. A., & Laird, D. W. (2016, February). Connexins in skeletal muscle development and disease. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 50, pp. 67-73). Academic Press.

- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5807-5812
- Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R., & Wu, D. K. (1998). Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *The Journal of neuroscience*, 18(9), 3327-3335.
- Morzaria, S., Westerberg, B. D., & Kozak, F. K. (2004). Systematic review of the etiology of bilateral sensorineural hearing loss in children. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 68(9), 1193-1198.
- Motta, L. H. C., Félix, T. M., de Souza, L. T., Lavinsky-Wolff, M., Costa-Motta, F. M., de Faria, M. R., & Lavinsky, L. (2012). Prevalence of the 35delG mutation in deaf South Brazilian infants submitted to cochlear implantation. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 76(2), 287-290.
- Muhrad, D., & Parker, R. (1999). Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *Rna*, 5(10), 1299-1307.
- Nagy, J. I., Ionescu, A. V., Lynn, B. D., & Rash, J. E. (2003). Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia*, 44(3), 205-218.
- Niger, C., Hebert, C., & Stains, J. P. (2010). Interaction of connexin43 and protein kinase C-delta during FGF2 signaling. *BMC biochemistry*, 11(1), 1.
- Nakamura, S., Yamada, Y., Katagiri, W., Sugito, T., Ito, K., & Ueda, M. (2009). Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *Journal of endodontics*, 35(11), 1536-1542.
- OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man, a knowledgebase of human genes and genetic disorders.
- Oshima, A. (2014). Structure and closure of connexin gap junction channels. *FEBS letters*, 588(8), 1230-1237.
- Pallares-Ruiz, N., Blanchet, P., Mondain, M., Low-Hong, S., Demaille, J., Claustres, M., & Paznekas, W. A., Boyadjiev, S. A., Shapiro, R. E., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C. E., ... & Jabs, E. W. (2003). Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *The American Journal of Human Genetics*, 72(2), 408-418.
- Pizard, A., Burgon, P. G., Paul, D. L., Bruneau, B. G., Seidman, C. E., & Seidman, J. G. (2005). Connexin 40, a target of transcription factor Tbx5, patterns wrist, digits, and sternum. *Molecular and cellular biology*, 25(12), 5073-5083.

- Plotkin, L. I., Manolagas, S. C., & Bellido, T. (2002). Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8648-8657.
- Pujol, R. (1985). Morphology, synaptology and electrophysiology of the developing cochlea. *Acta Oto-Laryngologica*, 99(sup421), 5-9.
- Qin, H., Zhao, L. D., Sun, J. H., Ren, L. L., Guo, W. W., Liu, H. Z., ... & Yang, S. M. (2011). The differentiation of mesenchymal stem cells into inner ear hair cell-like cells in vitro. *Acta oto-laryngologica*, 131(11), 1136-1141.
- Rabionet, R., Gasparini, P., & Estivill, X. (2000). Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Human mutation*, 16(3), 190.
- Račkauskas, M., Neverauskas, V., & Skeberdis, V. A. (2010). Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)*, 46(1), 1-12.
- Richard, G., White, T. W., Smith, L. E., Bailey, R. A., Compton, J. G., Paul, D. L., & Bale, S. J. (1998). Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Human genetics*, 103(4), 393-399.
- Rivas, M. A., Pirinen, M., Conrad, D. F., Lek, M., Tsang, E. K., Karczewski, K. J., ... & Ferreira, P. G. (2015). Effect of predicted protein-truncating genetic variants on the human transcriptome. *Science*, 348(6235), 666-669.
- Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., & de Medina, F. S. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical biochemistry*, 401(2), 318-320.
- Roux, A. F. (2001). Evaluation of dHPLC for CX26 mutation screening in patients from southern France with sensorineural deafness. *Genetic testing*, 5(4), 339-343.
- Schichor, C., Albrecht, V., Korte, B., Buchner, A., Riesenberger, R., Mysliwietz, J., ... & Selbig, J. (2012). Mesenchymal stem cells and glioma cells form a structural as well as a functional syncytium in vitro. *Experimental neurology*, 234(1), 208-219
- Schrobbach, K., Klein, T. J., & Woodfield, T. B. (2015). The importance of connexin hemichannels during chondroprogenitor cell differentiation in hydrogel versus microtissue culture models. *Tissue Engineering Part A*, 21(11-12), 1785-1794.
- Sharovskaya, Y. Y., Philonenko, E. S., Kiselev, S. L., & Lagarkova, M. A. (2012). De novo reestablishment of gap junctional intercellular communications during reprogramming to pluripotency and differentiation. *Stem cells and development*, 21(14), 2623-2629.
- Shuja, Z., Li, L., Gupta, S., Meşe, G., & White, T. W. (2016). Connexin26 mutations causing palmoplantar keratoderma and deafness interact with connexin43, modifying gap

- junction and hemichannel properties. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(1), 225-235.
- Smith, R. J., Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., & Van Camp, G. (2014). Deafness and hereditary hearing loss overview.
- Steinberg, T. H., Civitelli, R., Geist, S. T., Robertson, A. J., Hick, E., Veenstra, R. D., ... & Laing, J. G. (1994). Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *The EMBO Journal*, 13(4), 744.
- Stout, C., Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2004). Connexins: functions without junctions. *Current opinion in cell biology*, 16(5), 507-512.
- Su, V., & Lau, A. F. (2012). Ubiquitination, intracellular trafficking, and degradation of connexins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 524(1), 16-22.
- Sun, Y., Tang, W., Chang, Q., Wang, Y., Kong, W., & Lin, X. (2009). Connexin30 null and conditional connexin26 null mice display distinct pattern and time course of cellular degeneration in the cochlea. *Journal of Comparative Neurology*, 516(6), 569-579.
- Tang, Q. Q., Otto, T. C., & Lane, M. D. (2003). Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(1), 44-49.
- Van Camp G., Smith R. Hereditary hearing loss homepage. World Wide Web URL: <http://hereditaryhearingloss.org/> (Acesso em 19 de maio de 2016).
- Vinken, M. (2016). Regulation of connexin signaling by the epigenetic machinery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(2), 262-268.
- Volponi, A. A., Pang, Y., & Sharpe, P. T. (2010). Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends in cell biology*, 20(12), 715-722.
- Wang, Y., Chang, Q., Tang, W., Sun, Y., Zhou, B., Li, H., & Lin, X. (2009). Targeted connexin26 ablation arrests postnatal development of the organ of Corti. *Biochemical and biophysical research communications*, 385(1), 33-37.
- Watt, F. M., & Hogan, B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 287(5457), 1427-1430.
- Wong, R. C., Dottori, M., Koh, K. L., Nguyen, L. T., Pera, M. F., & Pébay, A. (2006). Gap junctions modulate apoptosis and colony growth of human embryonic stem cells maintained in a serum-free system. *Biochemical and biophysical research communications*, 344(1), 181-188.
- Wong, R. C., Pébay, A., Nguyen, L. T., Koh, K. L., & Pera, M. F. (2004). Presence of functional gap junctions in human embryonic stem cells. *Stem cells*, 22(6), 883-889.
- Wörsdörfer, P., Maxeiner, S., Markopoulos, C., Kirfel, G., Wulf, V., Auth, T., ... & Willecke, K. (2008). Connexin expression and functional analysis of gap junctional communication in mouse embryonic stem cells. *Stem cells*, 26(2), 431-439.

- Xing, G., Chen, Z., & Cao, X. (2007). Mitochondrial rRNA and tRNA and hearing function. *Cell research*, 17(3), 227-239.
- Yanagiya, T., Tanabe, A., & Hotta, K. (2007). Gap-Junctional Communication Is Required for Mitotic Clonal Expansion during Adipogenesis. *Obesity*, 15(3), 572-582.
- Yang, R., Hu, Z. L., Kong, Q. T., Li, W. W., Zhang, L. L., Du, X., ... & Sang, H. (2016). A known mutation in GJB6 in a large Chinese family with hidrotic ectodermal dysplasia. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*.
- Yeganeh, A., Stelmack, G. L., Fandrich, R. R., Halayko, A. J., Kardami, E., & Zahradka, P. (2012). Connexin 43 phosphorylation and degradation are required for adipogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(10), 1731-1744.
- Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., LaDuca, J. P., & Maquat, L. E. (1998). At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation. *Molecular and cellular biology*, 18(9), 5272-5283.