

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



Olga Maria de Jesus Souza

**Junções Comunicantes no Epitélio Intestinal:
Modulação da Conexina 43 no Processo Infecto-
Inflamatório com *Toxoplasma gondii***

Duque de Caxias

2022

Olga Maria De Jesus Souza

**Junções Comunicantes no Epitélio Intestinal:
Modulação da Conexina 43 no Processo Infecto-
Inflamatório com *Toxoplasma gondii***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina translacional – UNIGRANRIO, em parceria com a Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ-ZO) e INMETRO, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biomedicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Fabio da S. de A. Fortes

Duque de Caxias

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE
BIBLIOTECAS

S729j Souza, Olga Maria De Jesus.

Junções comunicantes no Epitélio Intestinal: modulação da Conexina 43 no processo infecto-inflamatório com *Toxoplasma gondii* / Olga Maria De Jesus Souza. – Duque de Caxias, Rio de Janeiro. 2022.
92 f. il.

Orientador: Fabio da S. de A. Fortes.

Dissertação (mestrado) – UNIGRANRIO, Escola de Ciência da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional. Rio de Janeiro, 2022.

1. Epitélio Intestinal. 2. Células IEC-6. 3. Junção comunicante. 4. Conexina 43. 5. *Toxoplasma gondii*. 6. TNF- α . I. Fortes, Fabio da S. de A. II. Título. III. UNIGRANRIO.

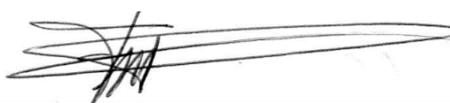
CDD: 610

OLGA MARIA DE JESUS SOUZA

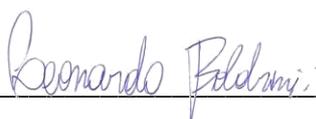
**Junções Comunicantes no Epitélio Intestinal: Modulação da Conexina 43 no
Processo Infecto-Inflamatório com *Toxoplasma gondii***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina translacional – UNIGRANRIO, em parceria com a Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ-ZO) e INMETRO, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biomedicina Translacional.

Rio de Janeiro, 06 de setembro de 2022.



Prof. Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes (Orientador – UERJ-ZO)



Prof. Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira (Membro Interno –INMETRO)



Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra (Membro Interno – UENF)



Prof.ª. Dr.ª. Regina Coeli dos Santos Goldenberg (Membro Externo – UFRJ)

Duque de Caxias

2022

RESUMO

Introdução: A Toxoplasmose é uma doença causada por um protozoário intracelular obrigatório, denominado *Toxoplasma gondii*. Esta parasitemia pode ser adquirida de várias formas, e dentre elas a forma mais comum de contrair a doença se dá pela infecção oral, através da ingestão de oocistos ou cistos teciduais. Por isto, o estudo do epitélio intestinal pode proporcionar um melhor entendimento da primeira linha de defesa contra infecções oriundas da via oral. A integridade da camada de células epiteliais intestinais é mantida por junções celulares, dentre elas as Junções Comunicantes, formadas pela Conexina 43 (Cx43), responsáveis por mediar as interações entre as células adjacentes. De acordo com a literatura, a expressão das junções comunicantes no epitélio intestinal pode ter envolvimento na modulação da resposta celular diante dos processos infecciosos, e por permitir a passagem de agentes importantes para o organismo no processo de infecção. **Objetivo:** Diante disto, o presente estudo tem como objetivo geral: Avaliar a modulação das junções comunicantes formadas pela Cx43 durante o processo de infecção do *Toxoplasma gondii* na linhagem celular epitelial intestinal IEC-6 e durante o tratamento com TNF- α . **Métodos:** Para isso foram realizados os ensaios de: **(1)** Cultura de células epitelial intestinal IEC-6; **(2)** Infecção das células com a proporção 1:1, 5:1 e 10:1 protozoário durante 24, 48 e 72h; **(3)** Análise qualitativa e quantitativa da morfologia e do crescimento celular em ambientes infectados ou tratados com fatores pró-imunoinflamatórios; **(4)** Ensaios de imunoeletroréticos (Western blot) em células controle, células infectadas e tratadas com o fator pró-imunoinflamatório; e **(5)** Ensaios de imunofluorescência para proteína Cx43 e F-actina, analisados por microscopia confocal. **Resultados:** As células IEC-6 infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii* apresentaram alterações morfológicas consideráveis e uma sensível diminuição em seu tempo de vida celular. Por outro lado, o tratamento com TNF- α em baixa concentração conseguiu promover o aumento do número de células, após 48h de incubação. Por ensaios imunoeletroréticos, foi demonstrado que as células IEC-6 infectadas com o *Toxoplasma gondii* apresentavam variações nos níveis da proteína Cx43, de acordo com o tempo de infecção. Além disso, foi possível observar por imunofluorescência que a localização da proteína Cx43 é reduzida na membrana plasmática das células IEC-6 após a infecção com parasita de *T. gondii*. Este mesmo processo de infecção também gerou uma representativa desorganização do citoesqueleto, quando analisada a marcação dos filamentos de F-actina. **Conclusão:** Desta forma, é possível indicar com os presentes dados que a infecção com o *T. gondii* promove alterações no microambiente, bem como na morfologia e proliferação celulares, associadas com uma considerável desorganização do citoesqueleto, o que interfere diretamente no transporte da Cx43 para a membrana plasmática. Isto pode reduzir sobremaneira a comunicação intercelular e conseqüentemente as funções do epitélio intestinal. Por outro lado, o fator pró-imunoinflamatório TNF- α se mostrou promissor no processo de ativação das células intestinais IEC-6, mantendo a morfologia celular e promovendo um considerável aumento na quantidade de células, podendo ser um dos fatores a serem utilizados em ensaios de recuperação e proteção celular em ambiente de infecção parasitária.

Palavras-chave: Epitélio Intestinal, Células IEC-6, Junção comunicante, Conexina 43, *Toxoplasma gondii*, TNF- α .

ABSTRACT

Introduction: Toxoplasmosis is a disease caused by an obligate intracellular protozoan called *Toxoplasma gondii*. This parasitemia can be acquired in several ways, and among them the most common form of contracting the disease is through oral infection, through the ingestion of oocysts or tissue cysts. Therefore, the study of the intestinal epithelium can provide a better understanding of the first line of defense against infections originating from the oral route. The integrity of the intestinal epithelial cell layer is maintained by cell junctions, including gap junctions, formed by Connexin 43, responsible for mediating interactions between adjacent cells. According to the literature, the expression of gap junctions in the intestinal epithelium may be involved in the modulation of the cellular response to infectious processes, and for allowing the passage of important agents to the organism in the infection process. **Objective:** In view of this, the present study has the general objective: To evaluate the modulation of gap junctions formed by Connexin 43 (Cx43) during the process of *Toxoplasma gondii* infection in the intestinal epithelial cell line IEC-6 and during treatment with TNF- α . **Methods:** For this, assays were performed: (1) IEC-6 intestinal epithelial cell culture; (2) Infection of cells with 1:1, 5:1 and 10:1 protozoan during for 24, 48 and 72h.; (3) Qualitative and quantitative analysis of cell morphology and growth in environments infected or treated with pro-immunoinflammatory factors; (4) Immunoelectrophoretic assays (Western blot) in control cells, infected cells and cells treated with the pro-immunoinflammatory factor; and (5) Immunofluorescence assays for Cx43 protein and F-actin, analyzed by confocal microscopy. **Results:** The IEC-6 cells infected with the parasite *Toxoplasma gondii* showed considerable morphological changes and a significant decrease in their cellular lifespan. On the other hand, treatment with TNF- α at low concentration was able to promote an increase in the number of cells after 48h of incubation. By immunoelectrophoretic assays, it was demonstrated that the IEC-6 cells infected with *Toxoplasma gondii* had variations in the levels of protein Cx43, according to the time of infection. Furthermore, it was possible to observe by immunofluorescence that the localization of the Cx43 protein is reduced in the plasma membrane of IEC-6 cells after infection with a *T. gondii* parasite. This same infection process also generated a representative disorganization of the cytoskeleton, when the labeling of F-actin filaments was analyzed. **Conclusion:** In this way, it is possible to indicate with the present data that infection with *T. gondii* promotes changes in the microenvironment, as well as in cell morphology and proliferation, associated with considerable disorganization of the cytoskeleton, which directly interferes with the transport of Cx43 to the plasma membrane. This can greatly reduce intercellular communication and consequently the functions of the intestinal epithelium. On the other hand, the pro-immunoinflammatory factor TNF- α showed promise in the process of activating IEC-6 intestinal cells, maintaining cell morphology and promoting a considerable increase in the number of cells, which may be one of the factors to be used in assays. recovery and cell protection in an environment of parasitic infection.

Keywords: Intestinal Epithelium, IEC-6 Cells, Gap junction, Connexin 43, *Toxoplasma gondii*, TNF - α

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Trato Gastrointestinal	13
Figura 2 - Cripta de Lieberkühn	14
Figura 3 - Micrografias eletrônicas de varredura de células IEC-6	16
Figura 4 - Ilustração das junções celulares	17
Figura 5 - Canais transmembranares formados pelas conexinas	19
Figura 6 - Esquema da organização dos canais juncionais	20
Figura 7 – Estrutura molecular da conexina	22
Figura 8 - Tipos de conexons e canais juncionais	24
Figura 9 - Formação e posicionamento da conexina	25
Figura 10 - Formação da placa juncional	26
Figura 11 - Cadeia esquemática do processo de aquisição da toxoplasmose	29
Figura 12 – Oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	32
Figura 13 - Estrutura do taquizoíto	33
Figura 14 - Processo de endodiogenia	35
Figura 15 - Conformação em roseta dos taquizoítos	36
Figura 16 – Bradizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i>	37
Figura 17 - Esquema do ciclo sexual do <i>Toxoplasma gondii</i>	40
Figura 18 - Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	41
Figura 19 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 24 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (10x)	51
Figura 20 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 24 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (40x)	52
Figura 21 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 48 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (10x)	53
Figura 22 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 48 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (40x)	54
Figura 23 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 72 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (10x)	55
Figura 24 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 72 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (40x)	56
Figura 25 – Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após tratamento com TNF- α utilizando células da Linhagem IEC-6 (10x)	58
Figura 26 – Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após tratamento com TNF- α utilizando células da Linhagem IEC-6 (40x)	59
Figura 27 – Contagem de células	60
Figura 28 – Imunoeletrotransferência da linhagem IEC-6	61
Figura 29 - Imunofluorescência do controle da linhagem IEC-6	64
Figura 30 - Imunofluorescência da linhagem IEC-6 com 24h de infecção com <i>Toxoplasma gondii</i>	65
Figura 31 - Imunofluorescência da linhagem IEC-6 com 48h de infecção com <i>Toxoplasma gondii</i>	66
Figura 32 - Imunofluorescência da linhagem IEC-6 com 72h de infecção com <i>Toxoplasma gondii</i>	67
Figura 33 - Análise de distribuição	68
Figura 34 - Esquema demonstrando as proteínas que possivelmente estão envolvidas com a inserção da Cx43 na membrana plasmática	79

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Família multigênica das conexinas	19
Tabela 2 - Taxa de transmissão transplacentária da toxoplasmose	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP - Adenosina trifosfato

°C - Graus Celsius

ANOVA - Análise de variância

BSA - Albumina Bovina

Ca⁺² - Cálcio

Caco-2 – Linhagem celular derivada de adenocarcinoma colorretal

cm² - Centímetros quadrado

CO² - Dióxido de Carbono

COOH - Carboxi-terminal

C-terminal - Carboxi-terminal

Cx43 - Conexina 43

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium

DTA - Doenças transmitidas por a Doenças Transmitidas por Alimentos

E1 - Extracelular 1

E2 - Extracelular 2

Ed - Edição

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF - Fator de crescimento epidérmico

h - Hora

H⁺ - Hidrogênio

IEC-6 - Célula epitelial intestinal 6

IFN- γ - Interferon- γ

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina

kDa - KiloDalton

mg⁺²- magnésio

ml - Mililitro

mM - Milimolar

NADH - Nicotinamida e adenina dinucleotídeo

nm - Nanômetro

N-terminal - amino-terminal

P/V - Peso/Volume

p - Página

PBS - Tampão fosfato salino

pH - Potencial hidrogênico

RE - Reticulo Endoplasmático

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SFB - Soro Fetal Bovino

T.gondii - *Toxoplasma gondii*

TM1 - Transmembrana 1

TM2 - Transmembrana 2

TM3 - Transmembrana 3

TM4 - Transmembrana 4

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

UI/ml - Unidades internacionais por mililitro

UV - Ultra-violeta

Vero - linhagem celular oriunda de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*)

ZO - Zonula occludens

Sumário

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Epitélio Intestinal	13
2.2. Célula Epitelial Intestinal (IEC-6)	15
2.3. Junções Celulares	16
2.3.1. Junções Comunicantes.....	18
2.3.2. Formação das Junções Comunicantes.....	21
2.3.3. Fisiologia e Patologias Associadas a Conexina 43	27
2.4. <i>Toxoplasma gondii</i>	28
2.4.1. Aspectos Gerais	28
2.4.2. Aspectos Celulares Básicos.....	30
2.4.2.1. Oocisto	31
2.4.2.2. Taquizoíto.....	32
2.4.2.3. Bradizoíto	37
2.4.3. Ciclo de Vida	38
2.4.4. Manifestações Clínicas	41
2.4.5. Resposta inflamatória durante a invasão do <i>Toxoplasma gondii</i>	44
2.4.6. <i>Toxoplasma gondii</i> X Conexina 43	44
3 OBJETIVO	46
3.1. Objetivo Geral.....	46
3.2. Objetivo Especifico	46
4 METODOLOGIA	47
4.1. Cultura de Células Epiteliais Intestinais (IEC-6).....	47
4.2. Obtenção de Taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i>	47
4.3. Interação Parasito-Célula.....	47
4.4. Imunofluorescência	48
4.5. Determinação da concentração de proteína	49
4.6. Imunoeletrotransferência (Western Blot).....	49
5 RESULTADOS	50
5.1 Infecção com <i>Toxoplasma gondii</i> : Crescimento Celular e Aspectos Morfológicos	50
5.3 Infecção com <i>Toxoplasma gondii</i> + Tratamento com TNF- α : Expressão da Conexina 43.	60
5.4 Imunofluorescência da Linhagem Celular IEC-6	62
6 DISCUSSÃO	69
6.1 Células do Epitélio Intestinal: Alterações da Morfologia e do Crescimento Celular	69
6.1.1. Alterações Celulares na Parasitemia.....	69
6.1.2. Alterações Celulares na Estimulação Pró-Imunoflamatória.....	72
6.2 Expressão Proteica da Cx43 na Infecção por <i>T. gondii</i>	73
6.3 Localização da Cx43 em Células do Epitélio Intestinal	76
7 CONCLUSÃO	81
8 REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

No lúmen intestinal são encontrados diversos microrganismos comensais, provenientes da alimentação, os quais compõem a microbiota do intestino. Esses microrganismos vivem na superfície mucosa e atuam de forma a competir com outros microrganismos com potencial patogênico. Contudo, se esses microrganismos comensais ultrapassam a barreira intestinal e caem na circulação se tornam altamente nocivos ao hospedeiro (LOZUPONE *et al.*, 2012; MUNIZ *et al.*, 2012).

Segundo dados do Ministério da Saúde (2018), no Brasil, entre os anos de 2000 a 2017 foram notificados 12.503 Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), contudo somente 3.196 dos casos foram confirmados laboratorialmente. Onde cerca 2.340.201 pessoas foram expostas a alimentos contaminados com algum tipo de agente patogênico e se teve 236.403 casos de doenças registrados.

Corroborando com o exposto, conforme dados recentes do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), são notificados por ano uma média de 700 surtos de DTA, com envolvimento de aproximadamente 13 mil doentes. Diante disto, nem sempre o sistema imunológico consegue combater esses patógenos, promovendo assim por ano milhões de mortes no mundo (BRASIL, 2020).

A toxoplasmose é uma doença causada por um protozoário, intracelular obrigatório, denominado *Toxoplasma gondii* (MONTROYA e LIESENFELD, 2004; RAMÍREZ-FLORES *et al.*, 2019). Entre as diversas formas de se contrair essa parasitemia, pode-se destacar a infecção através da via oral, após a ingestão de oocistos ou de cistos teciduais (DUBEY *et al.*, 2005).

No Brasil, a prevalência de toxoplasmose é considerada alta, tendo em cerca de 50 a 80% das gestantes e mulheres em idade fértil infectadas e 4 a 5% correm risco de se infectar durante a gestação (REMINGTON *et al.*, 2006; ANDRADE e TONELLI, 2006).

Após a infecção pela via oral, o *Toxoplasma gondii* invade células intestinais, alterando a fisiologia e funções da barreira epitelial intestinal em algumas espécies de animais. (BURGER *et al.*, 2018)

Embora a invasão dos parasitas em células hospedeiras seja um evento conhecido, os efeitos da infecção por *T. gondii* na barreira intestinal ainda não estão bem estabelecidos (WEIGHT *et al.*, 2015; BRICEÑO *et al.*, 2016). Um estudo realizado por Trevizan *et al.* (2016) demonstrou que a infecção aguda com *T. gondii* causou alterações morfológicas na parede intestinal do duodeno em ratos.

Estudos têm investigado também o modo que fatores pró inflamatórios influenciam no avanço da parasitemia. Bout e Dimier (1993), observaram que o interferon- γ promove a inibição, de forma dose dependente, de *T. gondii* em células intestinais da linhagem IEC-6. Leaphart *et al.* (2007), mostraram que o interferon - γ prejudica as junções comunicantes, Cx43, que são importantes no processo de migração dos enterócitos, prejudicando assim o processo de restituição intestinal.

Pesquisas utilizando o TNF- α mostraram a regulação positiva da claudina-2 através da regulação da expressão do gene (MANKERTZ *et al.*, 2009). Deckert-Schlüter *et al.* (1998), mostraram em seu trabalho a ação do TNF- α em sinergismo com outros fatores inflamatórios são cruciais na resposta durante a Toxoplasmose murina.

Diante disto, o epitélio intestinal é um modelo celular que proporciona estudar a primeira linha de defesa contra infecções que podem ser adquiridas através da via oral, como a toxoplasmose. Neste contexto, é sabido que a integridade da camada de células epiteliais intestinais é mantida por junções celulares. Dentre elas, são destacadas neste trabalho as junções comunicantes, mediadas pela conexina 43, que são responsáveis por mediar as interações entre as células adjacentes.

A expressão das junções comunicantes na célula epitelial intestinal pode ter envolvimento na modulação da resposta da célula diante dos processos infecciosos, e por permitir a passagem de agentes importantes para o organismo no processo de infecção (CHEN *et al.*, 2014; LEAPHART *et al.*, 2007).

Portanto, diante deste cenário, é importante entender os possíveis mecanismos de interação entre a célula epitelial intestinal e o que modula positiva, ou negativamente, a comunicação e a barreira celular durante o processo infecto-inflamatório com o protozoário *Toxoplasma gondii*. Para isto, foi realizado o processo de interação celular com o parasita a fim de elucidar fatos importantes sobre o comportamento do epitélio intestinal e como o mesmo responde a tais estímulos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epitélio Intestinal

O intestino delgado é composto pelo duodeno, jejuno e íleo, e sua função principal é a finalização da digestão e absorção de nutrientes. Esta porção do intestino é dividida histologicamente em duas unidades: cripta e vilosidades (figura 1). As vilosidades têm a função de aumentar a superfície de contato, já a cripta do intestino delgado, também conhecida como cripta de Lieberkühn, é um sítio contínuo de renovação e proliferação celulares (GUYTON e HALL, 2011).

Figura 1 – Trato Gastrointestinal

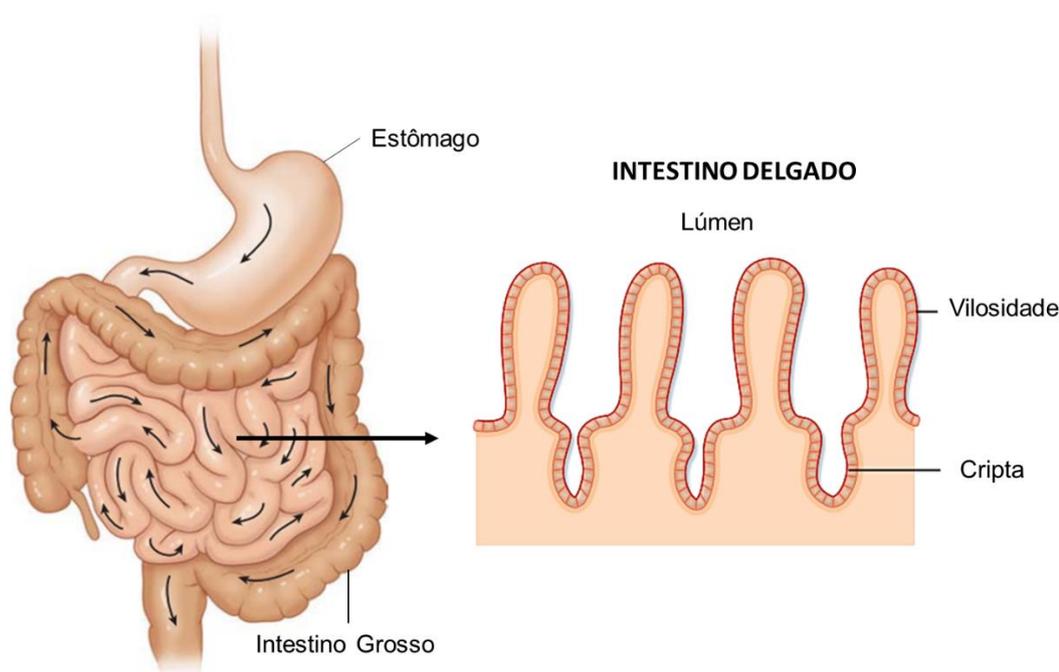


Ilustração de parte do trato gastrointestinal, dando destaque ao intestino delgado com suas vilosidades bem definidas (Adaptado de DEE SILVERTHORN *et al.*, 2017; BERNE e LEVY, 2009).

Na mucosa gastrointestinal encontra-se o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), que quando estimulados induzem a proliferação e diferenciação das células da cripta (ZNALESNIAK e HOFFMANN, 2010).

Como destacado nas literaturas acadêmicas básicas, as células provenientes da cripta de Lieberkühn se diferenciam em células absorptivas e secretoras. Após a diferenciação, essas células migram para a base da cripta em direção as vilosidades. Na superfície da cripta encontram-se células caliciformes e enterócitos (figura 2). As

células caliciformes que secretam muco que lubrifica e protege as superfícies intestinais e os enterócitos que, nas criptas, secretam e absorvem grandes quantidades de água e eletrólitos (BERNE e LEVY, 2009; GUYTON e HALL, 2011).

Figura 2 - Cripta de Lieberkühn

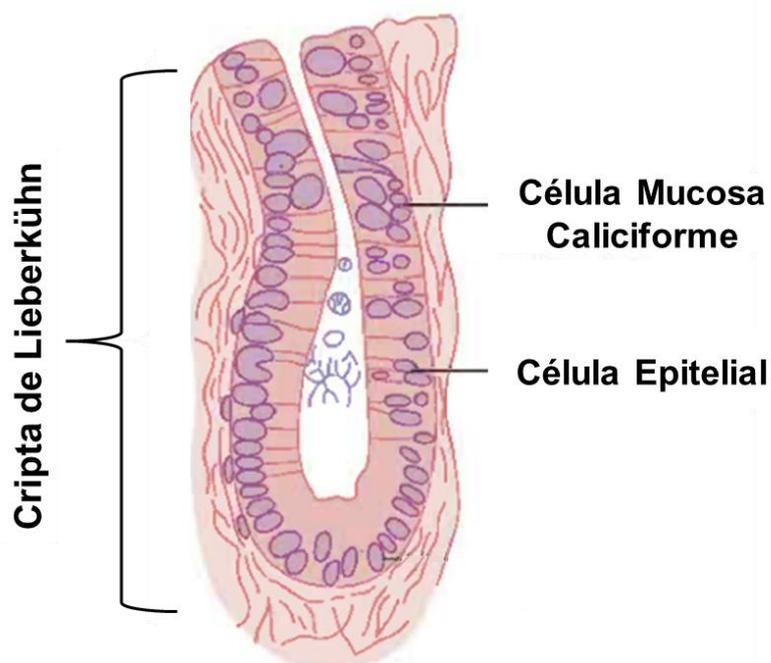


Ilustração mostrando a estrutura da cripta intestinal, região de depressão presente em abundância na superfície do intestino, que possui distintos tipos de células (Adaptado de GUYTON e HALL, 2011).

O ciclo de vida de uma célula epitelial intestinal tem duração de aproximadamente 5 dias e esta renovação contínua de células permite, ainda, a reparação rápida de lesões que ocorrem na mucosa (AIRES *et al.*, 2008).

O lúmen intestinal contém grandes quantidades de endotoxina e a mucosa intestinal forma uma barreira entre este material potencialmente prejudicial e o interior do hospedeiro (PODOLSKY *et al.*, 2009). Estudos mostraram que a barreira intestinal pode ficar comprometida em diversas doenças infecciosas, imunomediadas e idiopáticas, e por consequência podendo ocasionar a ativação de uma resposta imune sistêmica (ALLAM-NDOUL *et al.*, 2020).

Com isto, o epitélio intestinal apresenta um modelo celular que proporciona o estudo da primeira linha de defesa contra infecções provenientes da via oral, e a integridade da camada de células epiteliais intestinais é mantida por junções celulares.

Essas junções atuam selando o espaço intercelular e mediando a interação entre as células epiteliais intestinais e otimizando sua ação.

Estudos anteriores mostraram que o dano às células epiteliais intestinais pode inibir a atividade celular proliferativa na cripta e aumentar a permeabilidade da barreira epitelial intestinal, permitindo assim a passagens de agentes danosos ao organismo. Se absorvidos, esses agentes podem levar a uma resposta imune inflamatória sistêmica (ABIKO *et al.*, 2013).

2.2. Célula Epitelial Intestinal (IEC-6)

A Linhagem Celular Epitelial Intestinal (IEC- 6) foi desenvolvida e caracterizada por Quaroni *et al.* (1979), quando foram estabelecidas suas características por critérios morfológicos e imunoquímicos de células não diferenciadas da cripta do intestino delgado de *rattus norvegicus*.

Algumas características típicas do epitélio intestinal a serem destacadas na IEC-6 são: presença da borda em escova, que consiste em numerosas microvilosidades que se projetam da superfície de cada célula (figura 3), aumentando assim a área absorptiva. As mitocôndrias com cristas bem definidas, utilizam energia derivada da oxidação para formar adenosina trifosfato (ATP). Apresentam abundantes ribossomos livres e associados ao retículo endoplasmático, e são especificamente responsáveis pela síntese das proteínas. Os aparelhos de Golgi são bem desenvolvidos e atuam no processamento, armazenamento e distribuição de moléculas (QUARONI *et al.*, 1978).

Figura 3 - Micrografias eletrônicas de varredura de células IEC-6

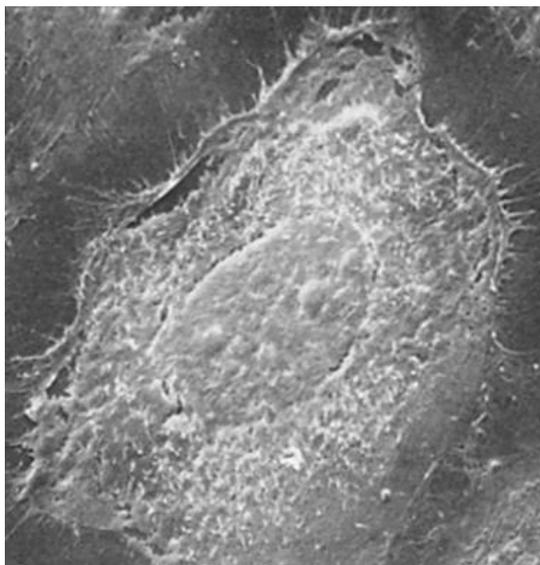


Imagem de microscopia eletrônica de Quaroni *et al.* (1978) apresenta a célula IEC-6 com a presença de numerosas microvilosidades em sua superfície e pseudópodos estendem-se as células vizinhas, estabelecendo contatos entre as células.

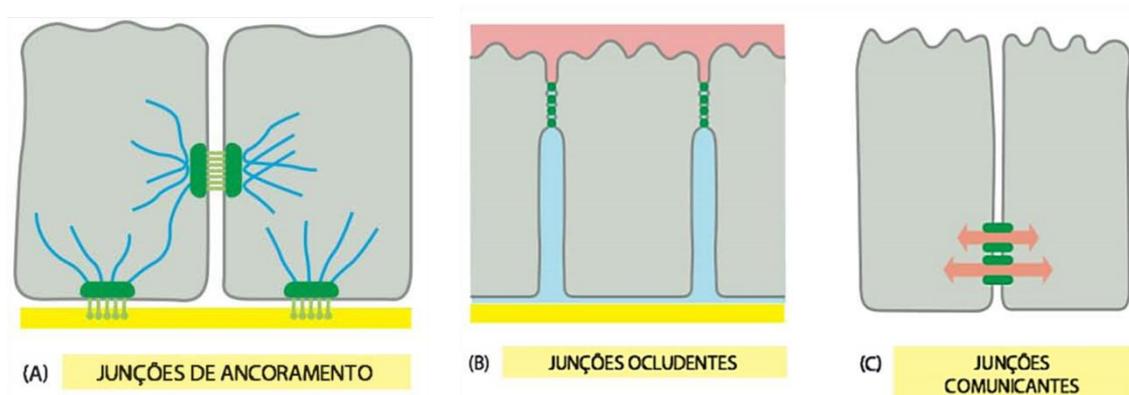
Diante das funções das células epiteliais intestinais já mencionadas, a expressão das junções comunicantes neste tipo celular pode desempenhar um papel importante na modulação da resposta da célula (CHEN *et al.*, 2014).

2.3. Junções Celulares

As junções celulares permitem a interação entre as células e possibilita que estas compartilhem sinais que regulam seu comportamento. Alterações na funcionalidade destas junções celulares são responsáveis por uma grande variedade de doenças. Portanto, são essenciais quando se trata da dinâmica tecidual (ALBERTS *et al.*, 2010).

Dentre as junções celulares, pode-se destacar: as junções de ancoramento (que compreende as adesões célula-célula e as adesões matriz-célula); as junções sinalizadoras (que permitem que os sinais sejam transmitidos entre as células através de sua membrana plasmática nos locais de contato célula-célula); as junções ocludentes (que bloqueiam o espaço intercelular do epitélio, estabelecendo assim uma barreira); e as junções comunicantes (que formam canais ligando citoplasmas de células adjacentes), conforme ilustrado na figura 4 (AIRES *et al.*, 2008; ALBERTS *et al.*, 2010).

Figura 4 - Ilustração das junções celulares



É possível observar em (A) junções de ancoramento, (B) junções ocludentes e (C) junções comunicantes (Adaptado de ALBERTS *et al.*, 2010).

Junções de ancoramento são junções de adesão célula-célula e junções de adesão célula-matriz, e suas estruturas são classificadas de acordo com suas ligações ao citoesqueleto. As junções de adesão célula-célula são divididas em dois tipos: as junções aderentes e os desmossomos. As junções aderentes formam um sítio de ancoramento para os filamentos de actina, e os desmossomos formam um sítio de ancoramento para os filamentos intermediários (ALBERTS *et al.*, 2010; CARTAGENA-RIVERA *et al.*, 2017).

As junções célula-matriz são divididas em: adesões célula-matriz ligadas por Actina e hemidesmossomos. As adesões célula-matriz ligadas por Actina, formam sítios de ancoramento do filamento de actina à matriz, já os hemidesmossomos formam sítios de ancoramento dos filamentos intermediários à matriz (CARTAGENA-RIVERA *et al.*, 2017).

Os quatro tipos de junções de ancoramento tem sua função desempenhada por proteínas transmembranares de adesão, e essas proteínas são denominadas caderinas e integrinas. As caderinas atuam nas ligações célula-célula. Já as integrinas atuam nas ligações célula-matriz (ALBERTS *et al.*, 2010).

A zonula ocludens (ZO) ou junção compacta é responsável por estabelecer junções de alta resistência e selar os espaços intercelulares entre as células (LI e POZNANSKY, 1990).

As junções ocludentes selam os espaços entre uma célula e outra, fazendo assim que as moléculas não consigam passar livremente, devido a isso é possível se ter uma permeabilidade seletiva (AIRES *et al.*, 2008).

A localização exata das proteínas mencionadas é essencial para que seja formado essa rede de fitas selantes, normalmente encontrada da região apical, compondo assim o complexo juncional (SKERRETT e WILLIAMS, 2017).

As junções ocludentes são compostas por proteínas de adesão transmembranares e são ligadas pelos seus domínios extracelular, bloqueando assim o espaço intercelular. Essas ligações são feitas, em sua maioria, por proteínas denominadas *claudinas* e *occludinas*, portanto essas proteínas originam as junções ocludentes. Uma terceira proteína encontrada é a tricelulina, que impede o vazamento transepitelial nas zonas onde são situadas três células, através do selamento das membranas celulares (FORSTER, 2008).

As junções comunicantes permitem que sejam realizadas trocas de metabólitos e informações necessárias, para a manutenção dos tecidos e suas respectivas funções, entre citoplasmas de células adjacentes. (FLAGG-NEWTON *et al.*, 1979; HERVE *et al.*, 2004).

2.3.1. Junções Comunicantes

Uma das principais estratégias de comunicação entre células é através das junções comunicantes. As junções comunicantes, também conhecida como junções tipo fenda, permitem a comunicação direta e bidirecional entre células vizinhas de substâncias menores que 1.000 dáltons (DHEIN, 1998; NIELSEN *et al.*, 2013).

Essas fendas são compostas por proteínas, similares em sua forma e função, denominadas *conexinas*. Essas proteínas formam canais transmembranares através do qual é possível a passagem, do citoplasma de uma célula para outra, pequenas moléculas hidrofílicas e íons inorgânicos, permitindo assim a comunicação entre as células (figura 5) (SOHL e WILLECKE, 2003).

Figura 5 - Canais transmembranares formados pelas conexinas

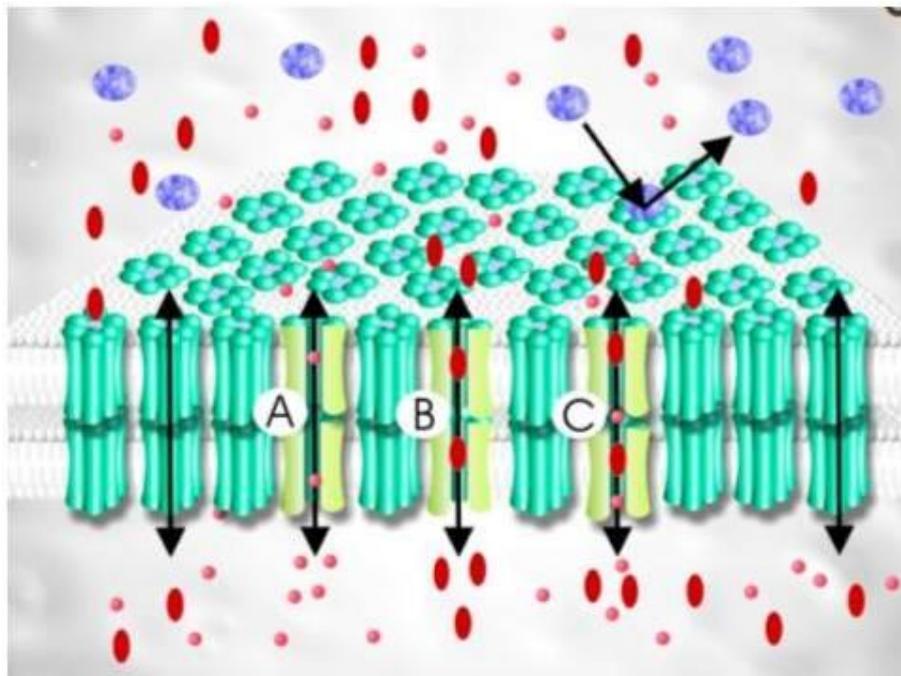


Ilustração das conexinas formando canais transmembranares, que não permitem a passagem de moléculas maiores de 1 kDa, e permitem a passagem de moléculas com menos de 1 kDa de formas distintas entre o citoplasma das células (A e B), como também as combinações de mais de uma molécula (C) (LAIRD, 2006).

Experimentos, realizados no final dos anos 60, em amostras previamente tratadas com nitrato de lantânio, permitiram a visualização através de microscopia eletrônica de transmissão de estruturas de padrão hexagonal com subunidades de 7 a 8nm de diâmetro, possuindo espaços de aproximadamente 2nm, entre as membranas das células adjacentes (REVEL e KARNOVSKY, 1967).

A estrutura juncional foi melhor esclarecida através da utilização da técnica de difração de raio X. Com isso foi possível observar um poro de 1.5nm formado por seis monômeros que com o alinhamento dos hemicanais na membrana ocorria a comunicação entre as membranas das células adjacentes (figura 6) (MAKOVSKI *et al.*, 1977; LAIRD, 2006; GOODENOUGH e PAUL, 2009; KOVAL *et al.*, 2014).

Figura 6: Esquema da organização dos canais juncionais na membrana plasmática

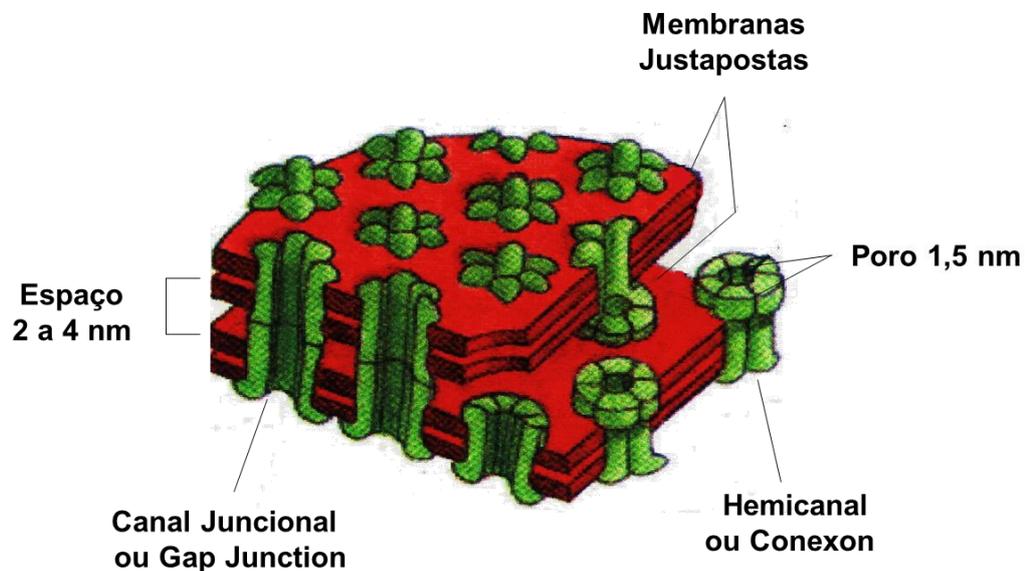


Figura apresenta a disposição das junções comunicantes na membrana plasmática onde cada junção consiste em dois conexons de padrões hexagonais. Os conexons apresentam entre as membranas das células adjacentes um espaço de aproximadamente 2 a 4nm. Cada conexon é composto por seis monômeros de subunidade de conexina organizadas ao redor de um poro central de 1.5nm de diâmetro que possibilita, através do alinhamento dos hemicanais, que se tenha comunicação entre as membranas das células adjacentes. (Makovski *et al.*, 1977; adaptado por Alberts *et al.*, 1994).

Existe diversas isoformas de conexinas (21 em humanos e 20 em ratos) descritas até o presente momento, conforme exibidos na tabela 1. Sua nomenclatura é dada de acordo com seu peso molecular (LIN *et al.*, 2014).

Tabela 1. Família multigênica das conexinas presentes no homem e no camundongo (Sohl e Willecke, 2003).

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

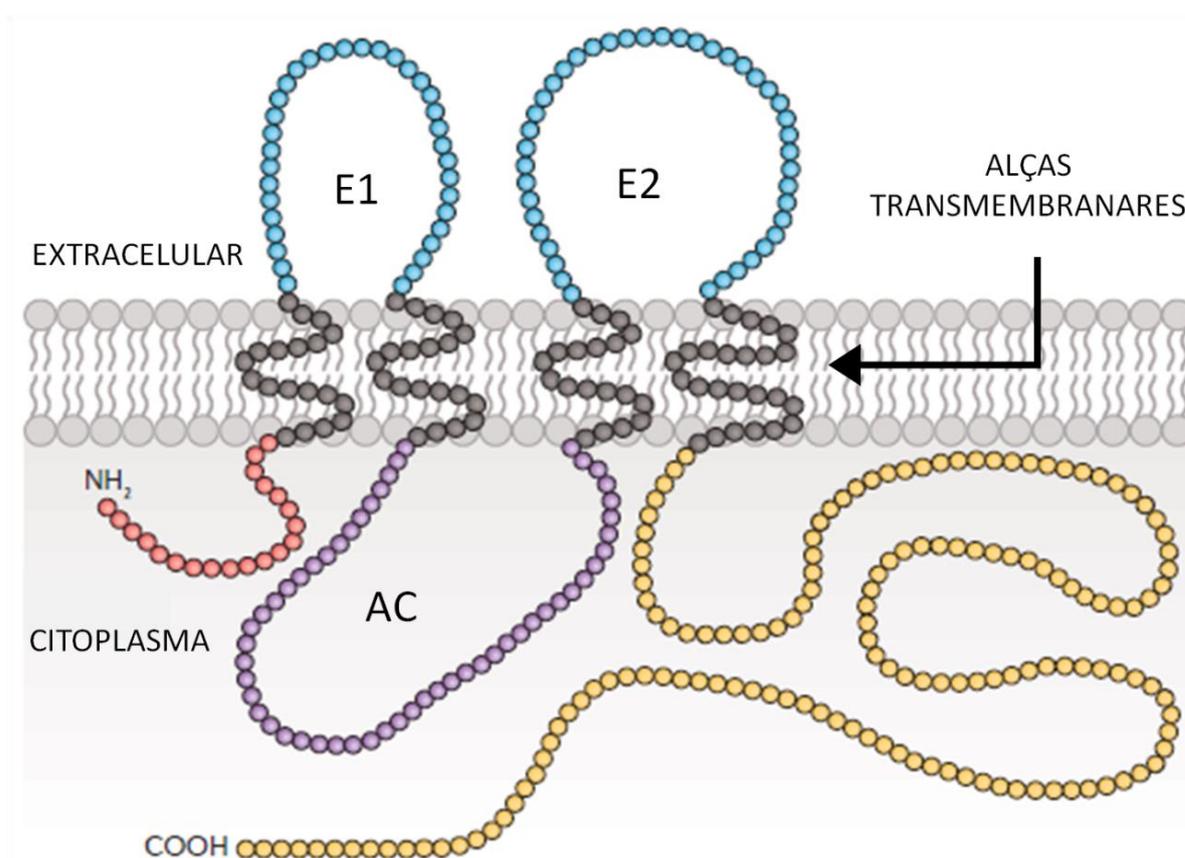
O canal juncional, além de possibilitar a passagem de moléculas com peso de até 1kDa, permite a propagação do impulso elétrico em mamíferos e apresenta uma via de baixa resistência (FLAGG *et al.*, 1979; KOVAL *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2016). Permitindo assim, a troca de íons e várias substâncias orgânicas extremamente importantes, como aminoácidos, nucleotídeos, AMPc e Inositol (SAEZ e SPRAY, 1991; DHEIN, 1998; HERVE *et al.*, 2004). Com isso as células são conectadas de forma elétrica e metabólica (GILULA *et al.*, 1972).

2.3.2. Formação das Junções Comunicantes

As junções comunicantes são formadas por uma família de proteínas conexas e podem ser divididas em nove domínios estruturais (figura 7). Os quatro domínios transmembranares da conexina, que apresentam uma estrutura em α -hélice (TM1, TM2, TM3 e TM4); uma porção C-terminal; uma porção N-terminal; duas alças extracelulares (E1 e E2); uma alça intracelular ou citoplasmática situada entre as regiões transmembranares 2 e 3, caracterizadas por representar a região de menor similaridade (AC) (KUMAR e GILULA, 1996; HERVE *et al.*, 2004).

As alças extracelulares e os domínios transmembranares são as regiões que apresentam maior conservação filogenética entre os integrantes da família das conexas, já o domínio carboxi-terminal e os demais apresentam pouca conservação filogenética (BENNETT *et al.*, 1991; DHEIN, 1998).

Figura 7 – Estrutura molecular da conexina



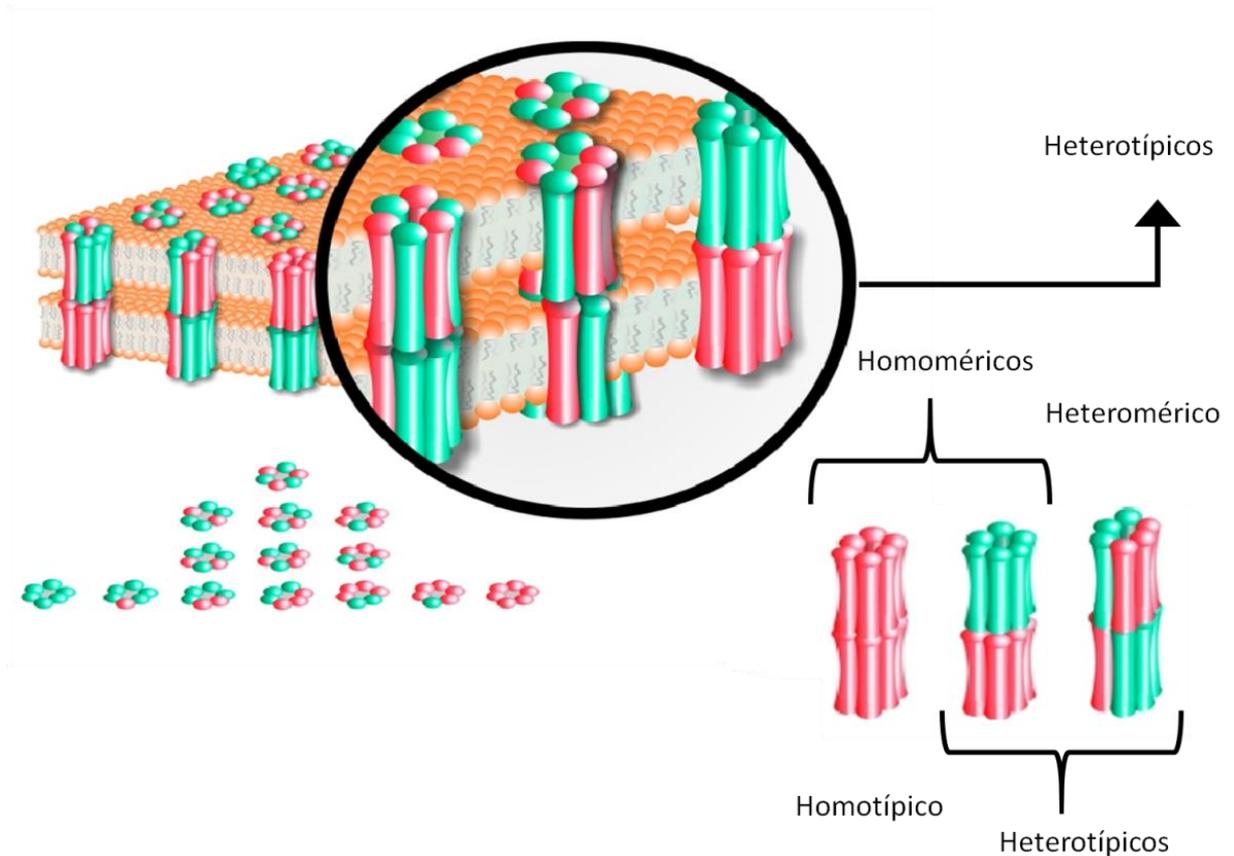
Descrição dos 9 domínios estruturais da conexina na membrana plasmática lido da esquerda pra direita. Porção amino-terminal localizada no citoplasma (NH₂), alça transmembranar 1, alça extracelular 1 (E1), alça transmembranar 2, alça citoplasmática (AC), alça transmembranar 3, alça extracelular 2 (E2), alça transmembranar 4 e porção carboxi-terminal (COOH) (Adaptado de LAIRD e LAMPE, 2018).

As conexinas apresentam uma organização na membrana plasmática sob a forma de hexâmeros e assim, constituem o hemicanal juncional, chamado de conexon. O conexon é constituído por seis proteínas que são organizadas em forma hexagonal (MAKOVSKI *et al.*, 1977; DERMIETZEL e SPRAY, 1993; KUMAR e GILULA, 1996; WHITE *et al.*, 1999; UNGER *et al.*, 1999; SEGRETAIN e FALK, 2004; KIM *et al.*, 2016; LILY *et al.*, 2016). Um canal juncional completo é formado quando há interação de forma não covalente com o conexon da célula adjacente (BENNETT *et al.*, 1991).

As junções comunicantes podem formar canais que apresentam diferença na permeabilidade. Isso é dado de acordo com as combinações distintas de conexinas. O arranjo de seis conexinas formado na membrana é chamado hemicanal ou conexon. Portanto, as conexinas se unem e formam conexons. Esses conexons podem ser homoméricos ou heteroméricos. Os conexons homoméricos são compostos por somente um tipo de conexina. Já os conexons heteroméricos são formados por mais de um tipo de conexinas, possibilitando assim propriedades distintas do conexon homomérico (SOSINSKY *et al.*, 2007; KOVAL *et al.*, 2014).

Quando dois conexons se unem eles formam canais intercelulares. Esses canais são denominados homotípicos, quando formado por conexons homoméricos, do mesmo perfil, portanto tais canais são constituídos por somente um tipo de conexina. Ou podem ser denominados canais heterotípicos, quando constituídos por dois conexons heteroméricos ou por dois conexons homoméricos, onde cada conexon possui conexinas de perfis distintos. Portanto, os canais heterotípicos possuem mais de um tipo de conexina (figura 8) (SOSINSKY *et al.*, 2007; KOVAL *et al.*, 2014).

Figura 8 - Tipos de conexons e canais juncionais



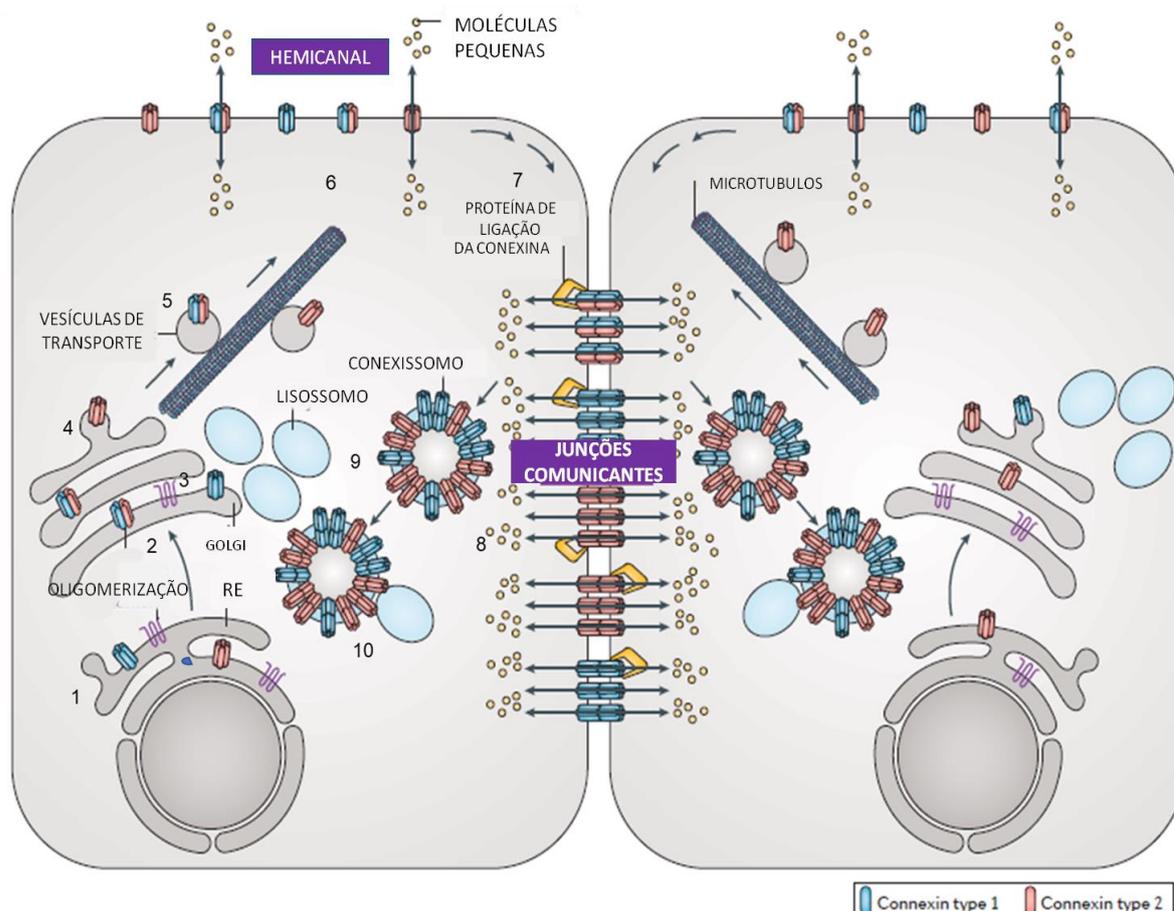
Esquema demonstrando os diferentes tipos de conexons e canais juncionais que são formados a partir da associação de conexinas que podem ser iguais ou diferentes. conexons formados por somente um tipo de conexina são chamados homoméricos. Conexons formados por conexinas distintas são denominados heteroméricos. Os canais juncionais formados por conexons iguais são chamados homotípicos. Canais juncionais formados por conexons diferentes são denominados heterotípicos (Adaptado de LAIRD, 2006).

O canal juncional completo é constituído pela interação de doze conexinas, ou seja, quando seis conexinas na membrana plasmática de uma célula se encaixam com hexâmeros compatíveis em uma célula adjacente. (KOVAL *et al.*, 2014). Ela é sintetizada no retículo endoplasmático e após é direcionada para o complexo de Golgi, onde fica armazenada até ser inserida na membrana da célula (SOSINSKY *et al.*, 2007).

Loewenstein (1981) descreveu a síntese das conexinas no retículo endoplasmático pelos ribossomos. As conexinas são co-traduzidas na membrana do retículo endoplasmático rugoso, em seguida são fosforiladas podendo ser oligomerizadas antes de ir para o complexo de Golgi como no caso das conexinas 26 e conexinas 32 ou podem ser transportadas ao complexo de Golgi para posterior

oligomerização como as conexinas 43. Posteriormente, os conexons (formados pela oligomerização das conexinas) são transportados do complexo de Golgi, pelos microtúbulos, dentro de vesículas, para a membrana plasmática das células (figura 9) (DHEIN, 1998; GAIETTA *et al.*, 2002; LAIRD, 2006).

Figura 9 - Formação e posicionamento da conexina



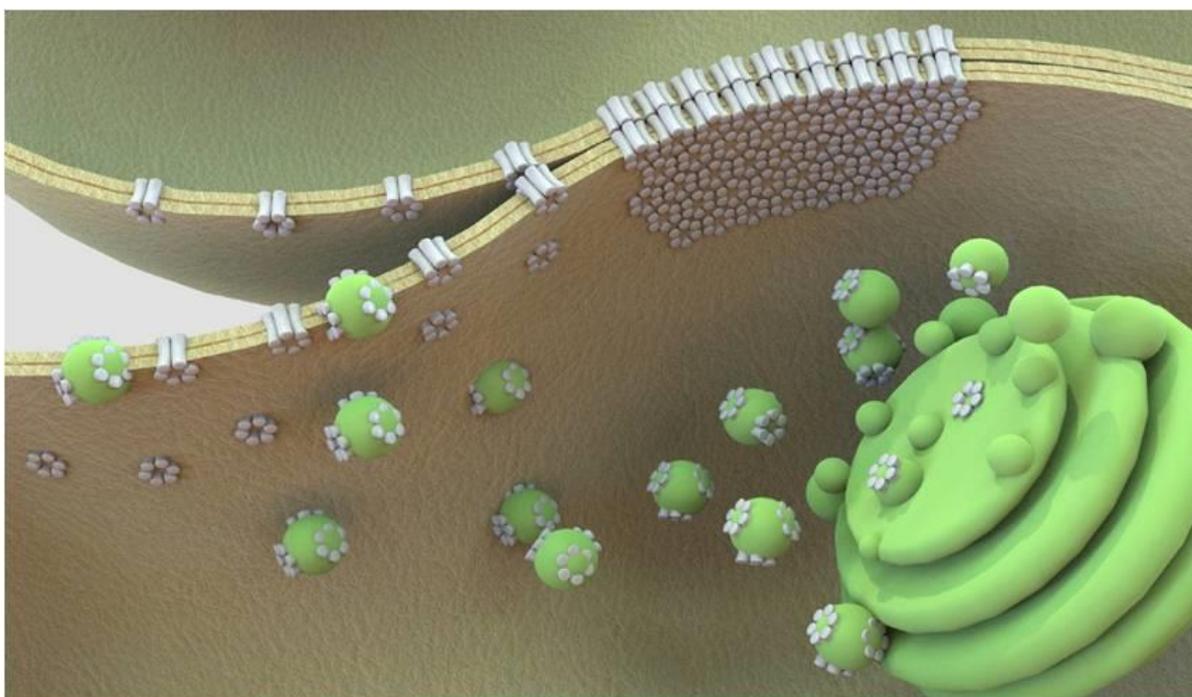
É possível observar em 1- Síntese da conexina, 2- Oligomerização, 3- Passagem RE – Golgi, 4- Armazenamento Intracelular, 5- Tráfego através de microtúbulos, 6- Inserção na membrana plasmática, 7- Difusão lateral na membrana citoplasmática, 8- Formação da placa de junções comunicantes, 9- Liberação das junções comunicantes da membrana, 10- Degradação final. (Adaptado de LAIRD e LAMPE, 2018).

Ao término do tempo de duração do canal, formado pelas conexinas, na membrana plasmática, o mesmo é internalizado e dentro de vesículas endocíticas, é degradado por lisossomos e proteossomos (YEAGER *et al.*, 1998; GAIETTA *et al.*, 2002; SEGRETAIN e FALK, 2004).

Gaietta *et al.* (2002) observaram por meio de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal através de ensaios com a conexina 43

recombinante, que quando termina o tempo de duração das conexinas, elas se centralizam para deixarem a placa das junções comunicantes na membrana das células, em vesículas endocíticas, enquanto as novas conexinas são inseridas na borda da placa e aos poucos vão preenchendo a placa juncional (figura 10).

Figura 10 - Formação da placa juncional



A placa juncional é formada na membrana plasmática da célula através da inserção de novas conexina (LAIRD, 2014).

Assim como os outros canais iônicos, os canais juncionais alteram entre os estados aberto e fechado (UNWIN e ZAMPIGHI, 1980; KOVAL *et al.*, 2014).

Alguns fatores podem influenciar a condutância das junções comunicantes, como por exemplo, alguns íons: Ca^{2+} , Mg^{2+} e H^+ . Estudos mostraram que concentrações elevadas de Ca^{2+} em cardiomiócitos proporcionam uma diminuição do acoplamento elétrico celular, acredita-se numa ação sinérgica entre H^+ e o Ca^{2+} (LOEWENSTEIN, 1966; NOMA e TSUBOI, 1987). O aumento das concentrações intracelulares de Mg^{2+} , em torno de 0,5 mM, também leva ao desacoplamento celular, sendo que as concentrações para esta ocorrência sejam bem maiores do que os níveis fisiologicamente toleráveis (NOMA e TSUBOI, 1987; PERACCHIA, 2004).

2.3.3. Fisiologia e Patologias Associadas a Conexina 43

A junção comunicante formada pela proteína conexina 43 (Cx43), assim como as outras junções comunicantes, permite a troca de informações e metabólitos entre células adjacentes, necessários para a homeostase tecidual (FLAGG-NEWTON *et al.*, 1979; HERVÉ *et al.*, 2004; EVANS, 2015). Por ser uma das conexinas mais expressa em diversos tecidos e órgãos é extremamente abundante no organismo, com isto, é atribuída a ela uma grande importância científica (PONCE *et al.*, 2016).

A conexina 43 é expressa em várias células como astrócitos, endotélio e microglia (CONTRERAS *et al.*, 2004). Estudos mostraram baixos níveis de conexina 43 nas micróglia em homeostase (GARG *et al.*, 2005). Contudo, se tem um aumento da expressão da conexina 43 quando essas células da microgliais são ativadas por alguma infecção ou dano cerebral (EUGENIN *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2016).

A comunicação intercelular, através das junções comunicantes, e seu papel funcional em neurônios, músculo liso e células cardíacas foi relatado por Severs *et al.* (2004). A junção comunicante também facilita a propagação do impulso elétrico nos cardiomiócitos possibilitando o sincronismo na contração cardíaca (WEIDMANN, 1972). Estudos recentes apontam que patologias cardíacas podem estar relacionadas com mudanças na quantidade e distribuição das junções comunicantes (POLONTCHOUK *et al.*, 2001; LAIRD, 2006; KIM *et al.*, 2016).

Ao longo dos anos, várias descobertas relacionadas às mutações das conexinas têm sido consideradas de extrema importância no entendimento e compreensão das diversas patologias, já que mutações na conexina 43 podem levar ao surgimento de malformações cardíacas e uma redução na sobrevivência animal, como demonstrado em camundongos “Knockout” para Cx43 (SEVERS *et al.*, 2004).

Estudos apontam que substâncias envolvidas na resposta inflamatória podem influenciar na expressão da conexina 43 e o comportamento celular. Alguns trabalhos demonstraram com o uso da IEC-6 que o interferon- γ inibe a restituição intestinal pela prevenção da comunicação entre os enterócitos através das junções comunicantes formadas por Cx43 (LEAPHART *et al.*, 2007).

A expressão das junções celulares na célula epitelial intestinal tem envolvimento na modulação da resposta da célula diante dos processos infecciosos por permitir a passagem de agentes importantes para o organismo, mas este mecanismo não está bem elucidado (CHEN, *et al.*, 2014; LEAPHART *et al.*, 2007).

2.4. Toxoplasma gondii

2.4.1. Aspectos Gerais

O protozoário *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório, agente etiológico da doença zoonótica toxoplasmose. Esse protozoário pode ser transmitido para o homem e outros animais homeotérmicos, e a principal forma de se contrair essa parasitemia é através da alimentação (TENTER *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2017).

Nos hospedeiros infectados, o parasita sofre desenvolvimento assexual e pode formar cistos teciduais. Os cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* na carne de animais representam um risco para os seres humanos se forem consumidas na forma crua ou sem processamento térmico adequado (TEUTSCH *et al.*, 1979; DUBEY *et al.*, 1998; MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

Contudo, os únicos hospedeiros definitivos, conhecidos, são os felinos, pois é no intestino dos felinos que ocorre a reprodução sexuada do parasita. Quando infectado o felino pode eliminar milhares de oocisto do protozoário em suas fezes, contaminando o solo, a água e os alimentos (figura 11). Diante disso, a toxoplasmose se torna uma ameaça à saúde pública (DUBEY *et al.*, 1998; ANDRADE e TONELLI, 2006).

As formas de se contrair a toxoplasmose são diversas, e comumente são encontradas em uma grande variedade de animais domésticos e silvestres, dentre eles podem ser destacados o cão, o gato, o coelho, o porco, o carneiro, o boi, o rato, o pombo e outras aves silvestres (DUBEY *et al.*, 1998).

Figura 11 - Cadeia esquemática do processo de aquisição da toxoplasmose



Os felinos podem adquirir o parasita através da ingestão de animais, água e vegetais contaminados, por sua vez estes podem contaminar animais silvestres, domésticos e causar a infecção humana. O homem que propaga a infecção através da contaminação de órgãos e sangue transferidos ou através das gestantes pela via transplacentária, levando assim a infecção ao feto (Mitsuka-Breganó *et al.*, 2010).

A toxoplasmose também atinge seres humanos, em todo o mundo, sob uma variedade de climas e circunstâncias socioeconômicas. No caso dos seres humanos, a infecção pode ocorrer pela ingestão de alimentos (solo) e água contaminados por oocistos, ingestão de cistos teciduais em carne malcozida, manuseio de lixo de gatos e alimentação com vegetais não lavados, por transplante, transfusão de sangue, acidentes laboratoriais ou pela infecção congênita (TEUTSCH *et al.*, 1979; TENTER *et al.*, 2001; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Foi demonstrado em estudos soropidemiológicos que animais em todo o mundo são comumente expostos ao *T. gondii*, animais caçados para consumo humano assim também como na pecuária. É importante ressaltar que, a soro prevalência do *T. gondii*

é variável entre os países, devido às diferenças nos hábitos alimentares e diferentes níveis de contaminação do ambiente pelo oocisto (TENTER *et al.*, 2000).

Segundo estudo publicado por Dubey *et al.* (2012), quase um terço da população mundial já foi exposta ao parasita. A estimativa, no Brasil, é que a cada 1000 crianças, 1 nasce infectada com o protozoário. E em torno de 50-80% das mulheres em idade fértil possuem anticorpos para *T. gondii* (REMINGTON *et al.*, 2006).

2.4.2. Aspectos Celulares Básicos

O ciclo evolutivo do *Toxoplasma gondii* apresenta três formas, sendo todas elas capazes de realizar a infecção. Tais formas são: taquizoítos (ocorre na fase aguda da doença e são capazes de infectar o feto ao atravessar a placenta); bradizoítos (encontrados nos tecidos dos seres humanos e de todos os animais infectados pelo protozoário) e esporozoítas que se encontram dentro dos oocistos (são exclusivamente formados no intestino de seus hospedeiros definitivos, os felinos) (MERCIER *et al.*, 2002).

Após a infecção aguda, o *Toxoplasma gondii* se mantém por toda a vida do hospedeiro sob a forma de cistos teciduais podendo ou não ocorrer manifestações clínicas em pessoas com baixa imunidade (BRASIL, 2014).

Existem 3 cepas distintas do protozoário, as quais são categorizadas em conformidade com sua virulência e a ocorrência epidemiológica. As cepas são classificadas como: tipo I (possui maior patogenicidade, contudo é o genótipo menos encontrado), tipo II (apresenta baixa virulência, entretanto é o genótipo mais frequente e tem relação direta com lesões oculares e com o retorno da toxoplasmose na fase aguda em imunocomprometidos devido à alta capacidade de formar cistos) e o tipo III (a incidência desse genótipo é principalmente em animais) (SIBLEY *et al.*, 2011).

Rey (2008), descreveu que a principal fonte de energia para o *T. gondii* é a glicose. Ela é oxidada de acordo com o esquema de Embden-Meyerhof denominado como glicólise. O açúcar é convertido em ácido láctico, ácido acético, dentre outros produtos. Já o oxigênio produz CO₂ no processo, o que causa oxidação de NADH pelo sistema citocromo. Tanto nos parasitas livres quanto nos intracelulares são encontrados reservas que se assemelham ao glicogênio, sob forma de pequenos grânulos, porém mais volumoso quando os parasitas estão contidos em cistos.

O *Toxoplasma gondii* pertence ao filo Apicomplexa o qual tem como característica a presença do complexo apical. Sua estrutura geral é composta por

róptrias e micronemas, que são organelas secretoras especializadas. Possui também, anéis polares próximo aos micronemas e um conjunto de microtúbulos dispostos em espiral, denominado conóide, sendo o *T.gondii* o único integrante do filo Apicomplexa que possui conóide (SOUZA *et al.*,2010).

2.4.2.1. Oocisto

O *Toxoplasma gondii* pode ser encontrado no meio ambiente na sua forma resistente, chamado de oocisto. Isso é dado pelo fato de que o oocisto tanto no solo como em fontes de água doce ou salinizada pode continuar viável e infectivo por períodos superiores há um ano (TENTER *et al.*, 2000).

Os oocistos (não esporulados) possuem um formato de esfera, uma parede com duas camadas e medem entre 10 e 12 μm de diâmetro. Já o oocisto esporulado são subsféricos a elipsoidais, possuem um diâmetro que varia de 11 a 13 micrometros e possuem 3 camadas de diferentes densidades (DUBEY *et al.*,1970; DUBEY *et al.*,1998; SIBLEY, 2011).

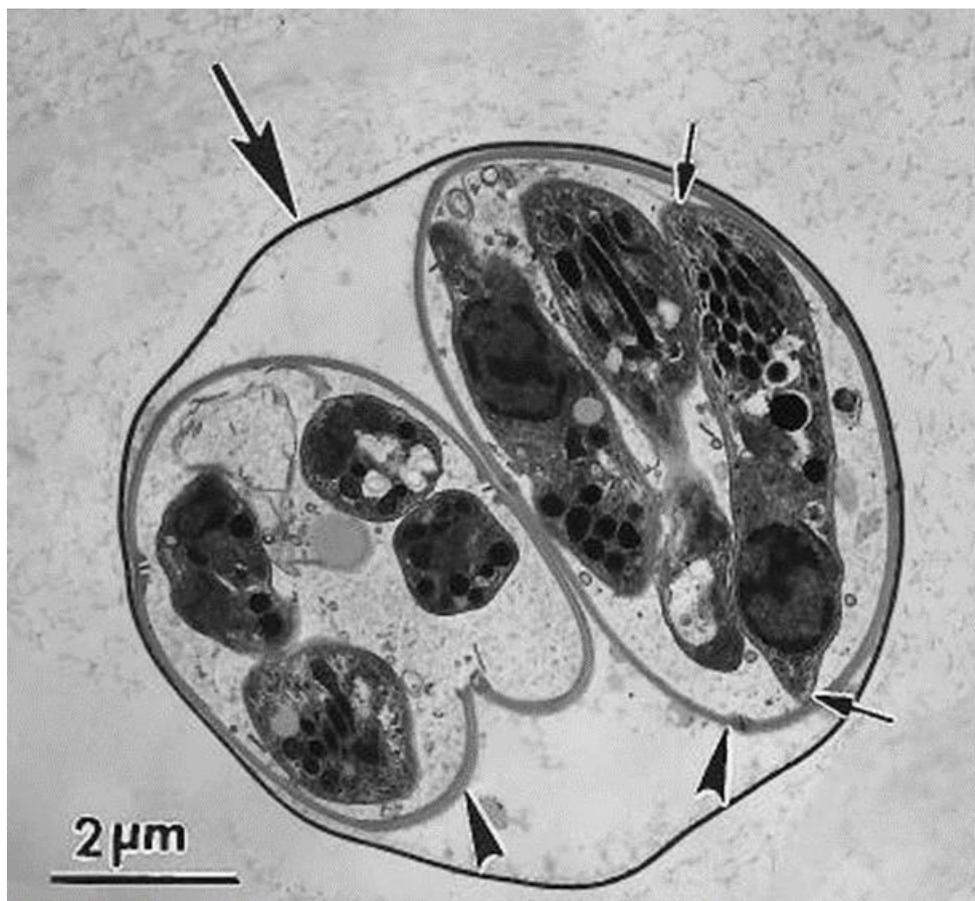
A camada intermédia tem em sua composição dois resquícios de membranas que, foram estabelecidas entre as camadas interior e exterior ao longo do processo de esporulação do oocisto. Cada oocisto contém dois esporocistos elipsoidais que medem entre 6 a 8 μm . E cada esporocisto contém quatro esporozoítos (figura 12) (DUBEY *et al.*,1998; SIBLEY, 2011).

Ferguson *et al.* (1978), descreveram que durante o processo de formação do esporozoíto, o citoplasma possui um distinto nucléolo e um grande núcleo com um nucleoplasma amorfo. O zigoto é limitado por uma única membrana com poucos microporos. O núcleo é dividido duas vezes, dando assim origem a quatro núcleos, os quais ficam localizados na periferia do zigoto. No processo se tem a formação de uma segunda membrana limitante, logo após se tem a divisão do citoplasma para formação de dois esporoblastos de formato esférico, onde cada um deles possuem dois núcleos.

Em seguida, esses esporoblastos são alongados para dar origem a formação dos esporocistos. A parede interna do esporocisto é formada pelas duas membranas externas dos esporoblastos. Durante seu desenvolvimento, quatro placas curvas formam a camada mais interna do esporocisto. Quando duas placas densas surgem nas extremidades dos esporocistos, se tem o início da formação dos esporozoítos. Em seguida o núcleo é separado em dois e é incorporado ao esporozoíto alongado, dando origem a quatro esporozoítos em cada esporocisto (FERGUSON *et al.*, 1978).

O processo de esporulação acontece no ambiente em um período de aproximadamente 1 a 5 dias após a sua excreção pelo felino podendo variar de acordo com as características do ambiente como, por exemplo, a temperatura. (SIBLEY, 2011).

Figura 12 – Oocistos de *Toxoplasma gondii*



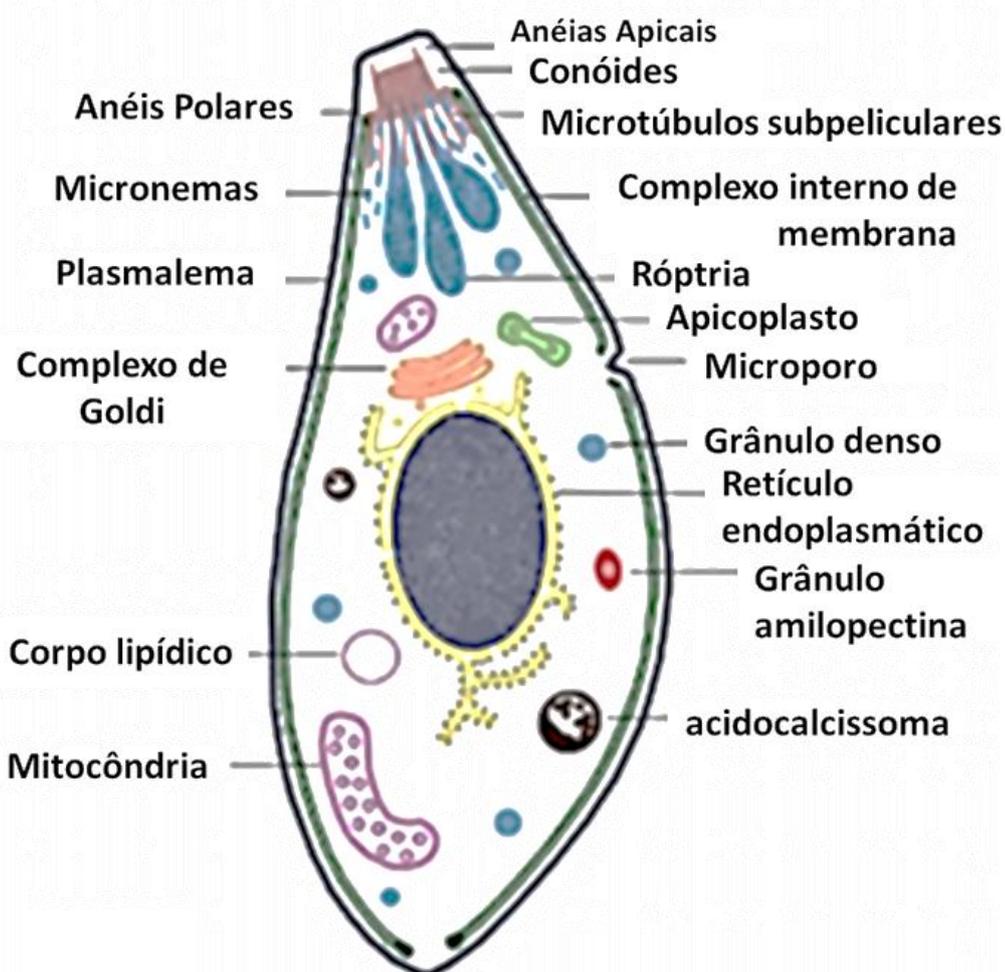
Micrografia eletrônica de transmissão (MET) mostrando um oocisto esporulado. A seta grande aponta a parede fina do oocisto, as pontas de setas apresentam os dois esporocistos e as setas pequenas apresentam um esporozoíto cortado longitudinalmente (DUBEY *et al.*, 1998).

2.4.2.2. Taquizoíto

O taquizoíto do *Toxoplasma gondii* é característico da fase aguda da toxoplasmose, sua estrutura possui aproximadamente 5 μ m de comprimento e 2 μ m de largura. É uma célula polarizada, de formato alongado, apresenta a região anterior (apical) afilada e a região posterior arredondada (BOOTHROYD e BLACK, 2000; BIRCHARD e SHERDING, 2003).

As estruturas que formam o complexo apical localizam-se na região anterior da célula (figura 13). Estas estruturas são os anéis polares, o conóide, as róptrias e os micronemas. Já na região mediana se tem localizado o núcleo celular e logo acima se encontra o complexo de Golgi e o apicoplasto. Elementos do retículo endoplasmático compõem o envoltório nuclear e ramificam-se pelo citosol além de possuir uma única mitocôndria, a qual é ramificada. Estão presentes em número e localização variáveis, os grânulos densos, acidocalcissomas e grânulos de amilopectina, os microtúbulos subpeliculares, irradiam do anel polar posterior percorrendo o corpo celular no eixo longitudinal até cerca de dois terços de sua extensão (SOUZA *et al.*, 2010).

Figura 13 - Estrutura do taquizoíto



As estruturas intracelulares do taquizoíto são os anéis polares, anéis apicais, conóides, microtúbulos subpeliculares, micronemas, complexos internos de membrana, plasmalema, róptria, apicoplasto, microporo, complexo de Golgi, grânulo denso, retículo endoplasmático, grânulo amilopectina, corpo lipídico, acidocalcissoma e mitocôndria (SOUZA *et al.*, 2010).

Estudos mostraram a possível associação das estruturas como conóide, roptrias, microporos, e micronemas, com a entrada do parasita na célula hospedeira e com a produção de um microambiente adequado para o crescimento e o desenvolvimento do parasita intracelular (DUBEY *et al.*, 1998).

O taquizoíto é envolvido por uma estrutura trimembranar, denominada película. A película é constituída pela membrana plasmática e pelo complexo membranar interno. O *T. gondii* se locomove através da associação da película com os elementos do citoesqueleto (SOUZA *et al.*, 2010).

Dubey *et al.* (1998), descreveram que o taquizoíto do *Toxoplasma gondii* não possuindo estruturas visíveis para se deslocar como cílios, flagelos ou pseudópodes. Contudo consegue se locomover por deslizamento, flexão ondulante e com movimentos rotatórios.

O taquizoíto do *Toxoplasma gondii* pode entrar nas células do hospedeiro por fagocitose ou pela penetração ativa através da membrana plasmática (DUBEY *et al.*, 1998). Durante a entrada do parasita na célula ocorre um processo denominado por junção móvel. Na junção móvel se tem a exclusão de diversas proteínas da superfície das células hospedeiras, pelo parasita, que através das diferenças no ancoramento na membrana plasmática e das interações com o citoesqueleto, influenciam na fluidez da membrana (SIBLEY, 2011).

Durante a adesão e após a invasão ocorre a secreção, na célula hospedeira, dos conteúdos das róprias, através de vesículas que posteriormente irão se fundir com a membrana do vacúolo (SOUZA *et al.*, 2010).

Dentro da célula hospedeira o parasita, taquizoíto, cercado pelo vacúolo parasitífero assume um formato oval. Tal vacúolo tem como principal característica ser não fuso gênico, com isso consegue evitar a fusão de elementos da via exocítica do hospedeiro com os lisossomas (DUBEY *et al.*, 1998).

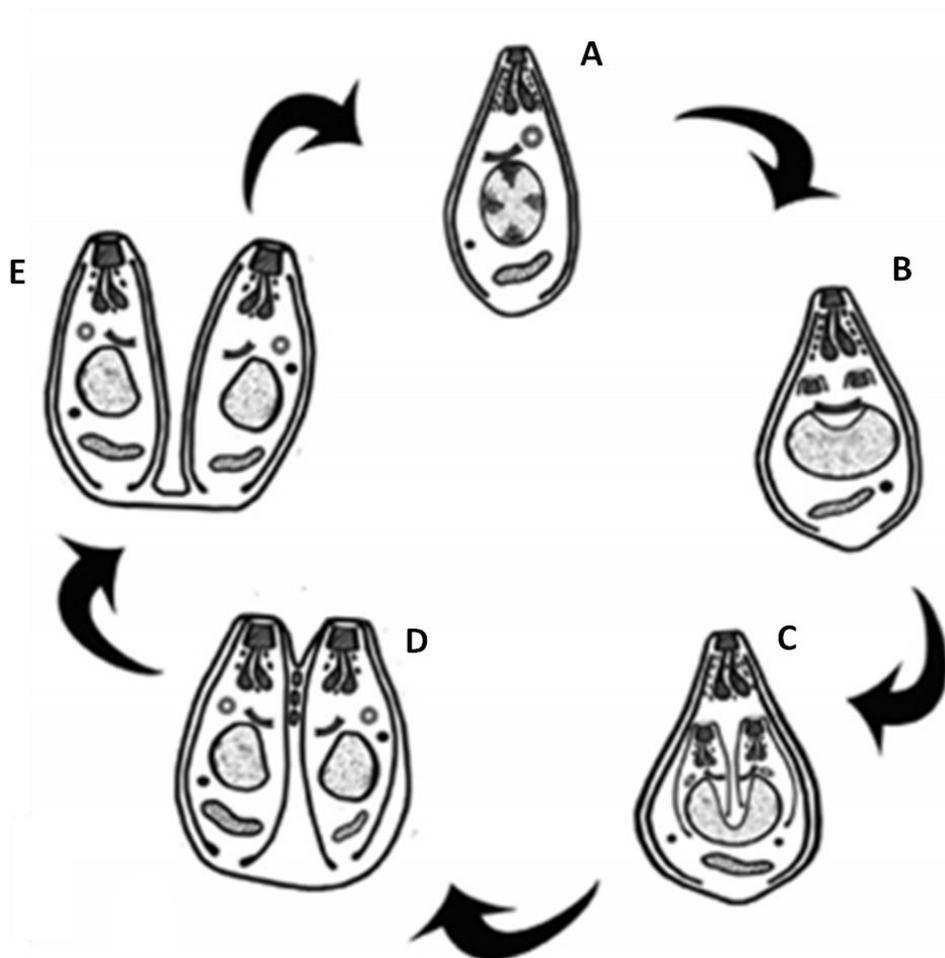
Em relação a multiplicação assexuada do *Toxoplasma gondii*, Dubey *et al.*, (1998), relataram que ocorre no interior das células hospedeiras através da endodiogenia (figura 14).

A endodiogenia é um processo especializado de reprodução onde se tem a formação de duas células filhas a partir do parasita original. Esse processo é iniciado através do alongamento do apicoplasto e complexo de Golgi (figura 14B). Em seguida ocorre a divisão do centrosomo na porção posterior ao núcleo e do complexo de Golgi. Após, se tem o surgimento de dois novos complexos apicais rudimentares, que

consiste em anéis apicais, anel polar posterior e conóide, que irão nuclear os microtúbulos subpeliculares e o complexo interno de membrana. As células filhas começam a serem definidas dentro da célula mãe a partir dessas estruturas membranares (SOUZA *et al.*,2010).

O núcleo é dividido por um processo denominado endomitose fechada. Durante a endomitose fechada o envelope nuclear continua intacto, com isso o núcleo adquire o formato de ferradura, com suas pontas crescendo em direção aos conóides (figura 14C). Concomitantemente com a formação dos dois núcleos filhos independentes, se tem o crescimento das estruturas membranas que vão envolvendo cada núcleo e outras organelas presentes (figura 14D) (BOOTHROYD e BLACK, 2000). A última organela a ser incorporada é a mitocôndria. Cada célula filha continua sua maturação até que o citoplasma e todo o seu conteúdo estejam divididos entre as duas proles (figura 14E) (SOUZA *et al.*,2010).

Figura 14 - Processo de endodiogenia

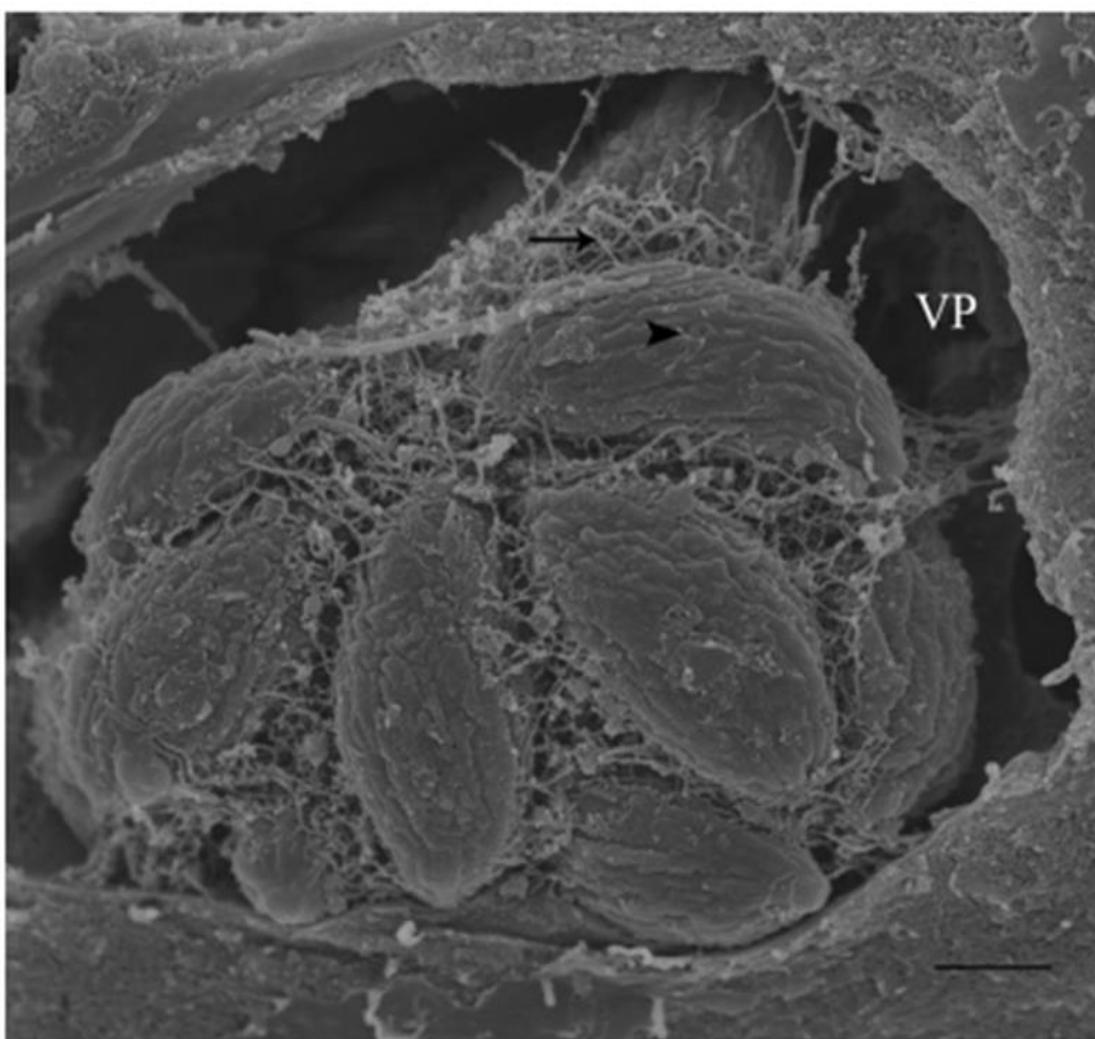


(Adaptado de SOUZA *et al.*, 2010)

Os taquizoítos são livres após a degradação da célula mãe, contudo ele ainda possui por um tempo sua extremidade superior unidas (BOOTHROYD e BLACK, 2000).

Os novos parasitas provenientes da endodiogenia fica organizados em forma de rosetas no interior dos vacúolos parasitóforo, mostrado na figura 15, em seguida passam ativamente pela membrana do vacúolo e rompem a membrana da célula, assim os taquizoítos ficam livres para infectar outras células (SOUZA *et al.*,2010).

Figura 15 - Conformação em roseta dos taquizoítos



Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de alta resolução mostrando a conformação em roseta dos taquizoítos e o vacúolo parasitóforo (VP). Também é possível observar uma rede de nanotúbulos (seta) promovendo a estabilidade da roseta e o microporo de um taquizoíto (Cabeça de seta). Barra: 1µm (SOUZA *et al.*,2010).

2.4.2.3. Bradizoíto

No hospedeiro infectado, os taquizoítas se diferenciam em bradizoítas e formam cistos teciduais que surgem de 7 a 10 dias após a infecção, marcando assim a fase crônica da toxoplasmose (BOOTHROYD e BLACK, 2000).

Os bradizoítas apresentam uma estrutura diferente dos taquizoítas. Enquanto os taquizoítas possuem o núcleo mais central os bradizoítas tem o núcleo localizado em direção a extremidade posterior, com menor susceptibilidade a destruição de enzimas proteolíticas e dispõem o formato mais delgado (figura 16) (DUBEY *et al.*, 1998).

Frenkel (1976), criou a palavra bradizoíto, que vem do grego “bradi”, e significa lento, remetendo-se ao *Toxoplasma gondii* se multiplicando de forma lenta dentro do cisto tecidual. Devido a isso o bradizoíto também pode ser chamado de cistozoíto. Tais cistos teciduais vão crescendo dentro da célula conforme os bradizoítas vão se dividindo através do processo de endodiogenia.

Os tamanhos dos cistos teciduais são variáveis. Um cisto contendo somente dois bradizoítas pode ter 5µm de diâmetro, enquanto um cisto antigo pode chegar a ter até centenas de cistozoítos em seu interior (DUBEY e FRENKEL, 1976).

Figura 16 – Bradizoíto de *Toxoplasma gondii*



Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) mostrando o Bradizoíto dentro do cisto tecidual. Co, conóide; Dg, grânulo eletrodenso; Mn, micronema; Rh, róptria; Pm, plasmalema; Am, grânulo de amilopectina; Im, complexo de membrana interna; Go, complexo de Golgi; Ga, adjunto de Golgi (apicoplasto); Mi, mitocôndria; Ce, centríolos; Nu, núcleo (DUBEY *et al.*, 1998).

Os cistos teciduais desenvolvem-se prevalentemente nos tecidos neurais e musculares, incluindo o cérebro, olhos e músculos (esqueléticos e cardíacos). Contudo podem ser encontrados também em órgãos viscerais, incluindo os pulmões, o fígado e os rins (BOOTHROYD e BLACK, 2000).

Geralmente os cistos teciduais possuem um formato esferoidal e dificilmente chegam a um diâmetro igual a 70 µm. Em contrapartida os cistos intramusculares tem formato alongado e podem atingir a 100 µm de comprimento. Os cistos teciduais quando intactos dificilmente irão causar algum dano, contudo podem permanecer durante toda a vida do hospedeiro, sem provocar uma resposta inflamatória (DUBEY *et al.*, 1998).

2.4.3. Ciclo de Vida

O ciclo e vida global do protozoário *Toxoplasma gondii* apresenta mais de um hospedeiro, portanto é denominado heteróxico. Possuindo os felinos como seu hospedeiro definitivo, devido ao fato de que somente nos felinos ocorre sua fase reprodutiva na forma sexuada, proporcionando a produção dos oocistos que posteriormente serão eliminados no meio ambiente juntamente com as fezes de seu hospedeiro definitivo (HILL e DUBEY, 2016).

De acordo com o ponto de vista epidemiológico, estudiosos consideram os felinos, os hospedeiros mais importantes para a toxoplasmose humana (HILL e DUBEY, 2016). De acordo com Elmore *et al.* (2010), a soroprevalência estimada em gatos domésticos (*Felis catus*), em todo o mundo, é de 30-40%.

Segundo Dubey *et al.* (1998), existem três estágios infecciosos no ciclo de vida do *T. gondii*: forma Esporozoíta (nos oocistos); forma Bradizoíta (nos cistos teciduais); e forma Taquizoíta (replicação assexuada).

A sua fase reprodutiva de forma assexuada acontece nos diversos hospedeiros intermediários e baseia-se em dois estágios distintos de acordo com a fase que a infecção se encontra: aguda ou crônica (SOUZA *et al.*, 2010).

Durante a fase aguda da toxoplasmose o parasita é apresentado na forma taquizoíta com uma elevada taxa de proliferação, enquanto a forma bradizoíta possui proliferação lenta e caracteriza a fase crônica (SOUZA *et al.*, 2010).

Normalmente, pode-se marcar como o começo do ciclo no hospedeiro intermediário, a partir do momento que se tem a ingestão do cisto tecidual em carnes crua ou malcozida pelo hospedeiro ou através da ingestão dos esporozoítas no

oocisto esporulado no meio ambiente através do consumo de água ou alimentos contaminados (DUBEY *et al.*, 1998; REY, 2008).

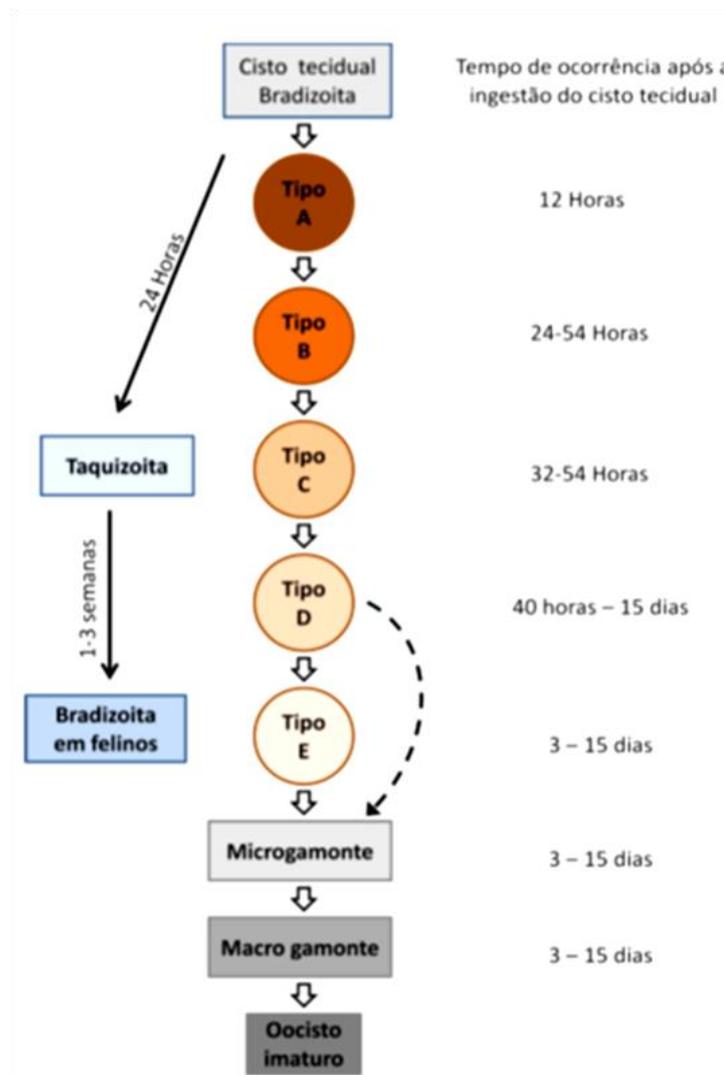
Quando se tem a ingestão do cisto tecidual pelo hospedeiro intermediário, ele passa pelo tubo digestivo e cai no intestino. É justamente no tecido intestinal onde o cisto tecidual libera os bradizoítas. Sendo este resistente às enzimas presentes no suco gástrico, passam rapidamente por um processo de diferenciação se transformando em taquizoítas. Os taquizoítas são capazes de invadir qualquer célula, com isso conseguem facilmente atravessar a barreira intestinal e se disseminam dentro do hospedeiro e levam à fase aguda da infecção (FERREIRA DA SILVA *et al.*, 2008; DUBEY *et al.*, 1998).

Quando ingerido, o oocisto esporulado do *Toxoplasma gondii* libera os esporozoítos no intestino. Esses esporozoítos passam pela parede intestinal e se difundem através da circulação sanguínea e linfática. Nesta fase de rápida multiplicação, o parasita é denominado taquizoíto. Os taquizoítos tem a capacidade de penetrar nas células de diversos tecidos e se multiplicarem de forma assexuada. Com isso, se tem um acúmulo de parasita, taquizoíto, intracelular. Esse acúmulo faz com ocorra o rompimento das células, deixando os taquizoítas livre para que outras células sejam infectadas. (BIRCHARD e SHERDING, 2003).

Segundo Hide (2016), células circulantes como, por exemplo, os macrófagos, possuem envolvimento no tráfego do taquizoíta pelo corpo do hospedeiro. Os taquizoítas também são a responsáveis pela transmissão vertical, da gestante para o feto, via placenta. Com a ação do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítas são diferenciados em bradizoítas, caracterizados pelo metabolismo lento, como método de evasão. Esses bradizoítos formam cistos teciduais em vários locais do corpo e assim dão origem a fase crônica da toxoplasmose (DUBEY *et al.*, 1998; FERREIRA DA SILVA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010).

Quando se tem a ingestão do cisto tecidual ou do oocisto esporulado, pelo hospedeiro definitivo, se tem a liberação do parasita no tecido intestinal do felino. O *Toxoplasma gondii* entra nos enterócitos e iniciam sua proliferação, este estágio é conhecido como enteroepitelial ou período pré-patente. O estágio enteroepitelial é caracterizado pelo tempo necessário para a proliferação de cinco tipos do parasita diferentes (tipo A, B, C, D e E) em sua morfologia, que vai do rompimento do cisto no intestino até antes do início da gametogonia (figura 17) (DUBEY e FRENKEL, 1976; DUBEY *et al.*, 1970, DUBEY *et al.*, 1998, HILL e DUBEY, 2002).

Figura 17 - Esquema do ciclo sexual do *Toxoplasma gondii*

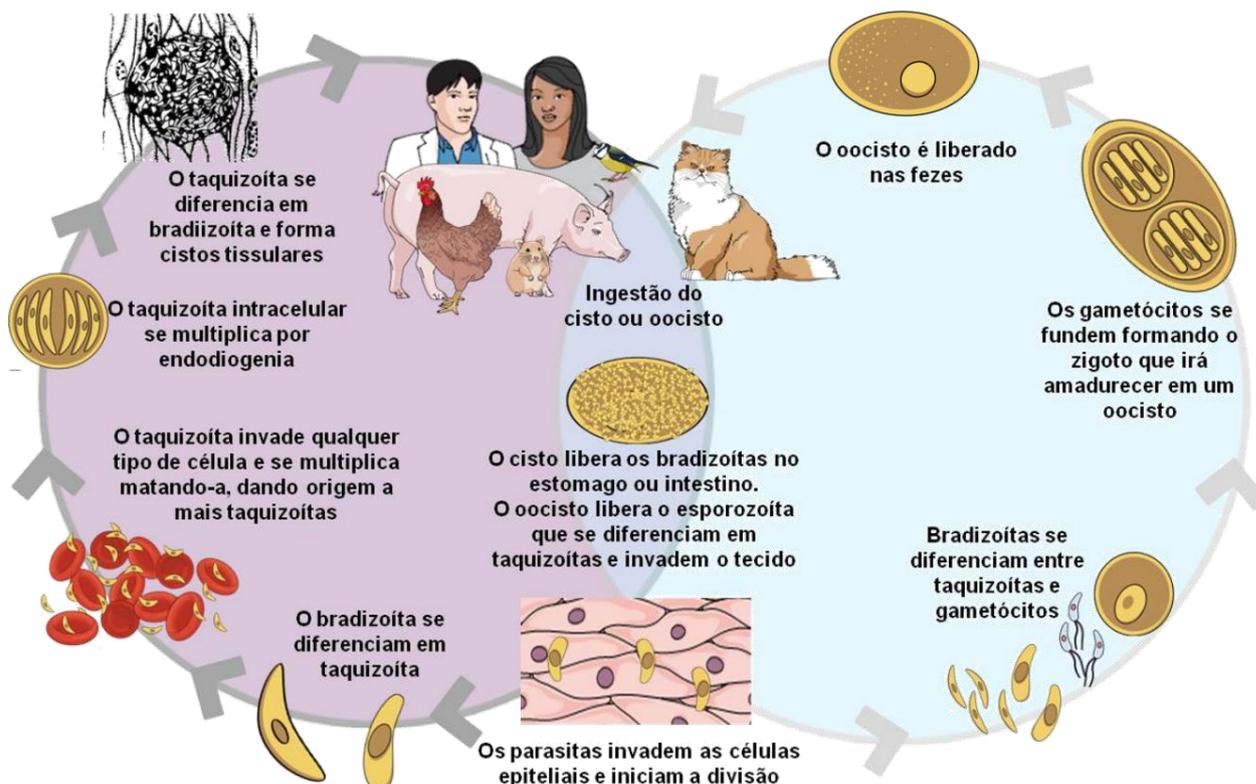


Esquema mostrando o estágio de enteroepitelial do ciclo sexual do *T. gondii* nos bradizoítas que passaram pelos estágios de diferenciação A, B, C, D e E, ao longo do tempo, originando o microgametócito que irá dar origem aos oocistos imaturos (DE CARVALHO, 2017 adaptado de DUBEY *et al.*, 1998).

Após a liberação dos bradizoítas dos cistos, eles invadem as células do intestino delgado e sofre uma diferenciação se transformando em esquizontes. Dentro dos enterócitos os esquizontes passam pelo ciclo coccidiano clássico se proliferando de forma assexuada, seguido da diferenciação em macro e microgamontes, os estágios dimórficos do desenvolvimento sexual. Os microgamontes fertilizam macrogamontes, produzindo zigotos diplóides que subsequentemente se desenvolvem em oocistos não esporulados que são excretados nas fezes do gato (figura 18). A fase sexual continua

dentro do oocisto à medida que se inicia a meiose, seguida por mitose para produzir esporozoítos infecciosos, dentro dos oocistos (HEHL *et al.*, 2015).

Figura 18 - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*



Com a ingestão do cisto ou oocisto pelo hospedeiro, o cisto libera os bradizoítas no estômago ou intestino e o oocisto libera o esporozoíto. No hospedeiro definitivo os bradizoítas se diferenciam entre taquizoítas e gametócitos. Os gametócitos se fundem formando o zigoto que posteriormente irá amadurecer em um oocisto que será eliminado nas fezes do felino. No hospedeiro intermediário os bradizoítas ou esporozoíto se diferenciam em taquizoítas e invadem os tecidos e dentro das células epiteliais iniciam sua divisão por endodiogenia, com o acúmulo de parasitas se tem a morte das células e a liberação de mais taquizoítos. Após a ação do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítas se diferenciam em bradizoítas e formam os cistos teciduais (DE CARVALHO, 2017).

2.4.4. Manifestações Clínicas

A toxoplasmose é uma doença bastante comum, contudo as manifestações clínicas dessa infecção são raras. Após a fase aguda da doença, o parasita continua no hospedeiro sob a forma de cistos teciduais podendo promover ou não repercussões clínicas em pessoas imunocompetentes (BRASIL, 2014).

Quando gestantes estão infetadas na fase aguda da toxoplasmose, possuem 40% de chances de o *Toxoplasma gondii* conseguir atravessar a placenta e assim infectar o feto (BOYER, 2000; HIDE, 2016).

A probabilidade de ocorrer a infecção congênita aumenta de forma significativa de acordo com a idade gestacional em que a mulher é infectada com o parasita como demonstrado na tabela 2, sendo estimado em 17% quando a infecção aguda ocorre no primeiro trimestre, 25% no segundo e 65% no terceiro trimestre. De forma inversa, a doença é mais grave quando o feto é infectado no primeiro trimestre de gestação, e geralmente leve ou assintomática no feto infectado ao longo do o terceiro trimestre (BOYER, 2000).

Tabela 2: Taxa de transmissão transplacentária e risco de desenvolvimento de sinais clínicos da toxoplasmose de acordo com a idade gestacional em que ocorreu a primoinfecção (Pinard *et al.*, 2003, adaptado de Dunn *et al.*, 1999).

Idade gestacional na qual ocorreu a soroconversão (semanas)	Transmissão transplacentária* (%)	Risco de a criança desenvolver sinais clínicos antes dos três anos de idade (%)
12	6	75
16	15	55
20	18	40
24	30	33
28	45	21
32	60	18
36	70	15
40	80	12

Em torno de 85% dos recém-nascidos com a parasitemia congênita não apresentam sinais clínicos notórios ao nascimento. Contudo, uma análise mais específica pode mostrar alterações tais como restrição do crescimento intrauterino, prematuridade, anormalidades líquóricas e cicatrizes de retinocoroidite. (REMINGTON *et al.* 2006; ANDRADE e TONELLI, 2006).

As manifestações clínicas, quando presentes, podem ser encontradas no período neonatal, como também ao longo dos primeiros meses de vida, podendo haver surgimento de sequelas da doença previamente não diagnosticada apenas na adolescência ou na idade adulta. Tais manifestações são diversas e inespecíficas.

Alguma delas são hidrocefalia, calcificações cerebrais, retinocoroidite, anormalidades motoras e surdez (REMINGTON *et al.* 2006; ANDRADE e TONELLI, 2006).

Aproximadamente 70% dos recém-nascidos irão desenvolver lesões oftalmológicas em algum momento da vida. Geralmente os casos de toxoplasmose congênita apresentam-se como de curso sub-agudo ou crônico, em que os parasitos invadem todos os órgãos, mas prevalecendo as lesões do sistema nervoso e da retina (PHAN *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que tais características clínicas foram descritas em estudos realizados em países europeus e nos Estados Unidos. Estudos recentes em brasileiros, no entanto, mostram que são mais frequentes lesões oftalmológicas, manifestando-se já ao nascimento, chegando a ocorrer em 80% dos bebês. Além disso, uma maior gravidade tem sido identificada, possivelmente devido à grande exposição a cepas mais virulentas do *Toxoplasma* ou a maior suscetibilidade da população. Devido a isso, nos últimos anos, tem-se dado maior atenção à detecção precoce de alterações oftalmológicas e ao acompanhamento ao longo prazo das crianças infectadas (PHAN *et al.*, 2006; REY, 2008; GILBERT *et al.*, 2008; VASCONCELOS-SANTOS *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010).

Após o nascimento o bebê infectado com o *Toxoplasma gondii* pode desenvolver adenopatia, afetando os gânglios cervicais se assemelhando a um linfoma. Também pode manifestar febre, mal-estar, dores musculares e articulares, no início da infecção. Tais casos podem ser acompanhados de prostração, hepatite, esplenite, miocardite e em casos mais graves meningite e encefalomielite. Dependendo da gravidade, o óbito ocorre em uma semana (SOUZA *et al.*, 2010).

Quando o paciente é imunodeficiente a toxoplasmose é extremamente grave, na maioria dos casos pode apresentar encefalite aguda, que pode levar a morte em poucos dias ou ter uma evolução mais lenta possibilitando o quadro de toxoplasmose extra cerebral (ocular, pulmonar ou cardíaca) (BOOTHROYD e BLACK, 2000). Foi demonstrado em estudos que a grande maioria dos pacientes apresenta febre e dor de cabeça. E as alterações das funções cerebrais manifestam-se por confusão, letargia, alucinações ou psicose, perda de memória ou do conhecimento e coma (PORTER e SANDER, 1992).

2.4.5. Resposta inflamatória durante a invasão do *Toxoplasma gondii*

As células epiteliais intestinais da mucosa também são capazes de produzir substâncias antimicrobiana como: citocinas, mucinas, óxido nítrico, dentre outros, que compõem a barreira química de proteção intestinal. Além das células epiteliais intestinais, também são encontrados outros tipos celulares como as células dendríticas e macrófagos que ajudam a modular todo esse microambiente inflamatório diante a um microrganismo patogênico (MUNIZ *et al.*, 2012; EROL *et al.*, 2018).

A sinalização do sistema imunológico desencadeia uma rápida alteração na barreira mucosa do intestino. Essas sinalizações são realizadas por fatores pró-imune inflamatórios, dentre eles podemos destacar Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e Interferon- γ (IFN- γ) e a interleucina 1 beta (IL-1 β). Contudo, a função da barreira intestinal pode ser prejudicada com a resposta inflamatória que envolva as células epiteliais intestinais. Quando os fatores pró-imunoinflamatórios estão presentes simultaneamente na cultura da IEC-6, é possível mimetizar de maneira eficiente um processo inflamatório no tecido epitelial intestinal (MUNIZ *et al.*, 2012; EROL *et al.*, 2018). Entretanto cada citocinas e quimosinas desempenham um papel específico no tecido, Leaphart *et al.* (2007) demonstraram que o interferon- γ inibe a restituição intestinal pela prevenção da comunicação entre os enterócitos utilizando as junções comunicantes.

Outros estudos como o de Richter *et al.* (2012) e Chen *et al.* (2014) demonstraram que o LPS diminui a restituição em lesões nas células intestinais. O reparo da superfície da mucosa intestinal ocorre em várias etapas, a primeira delas envolve células epiteliais adjacentes que migram para dentro da ferida. Este é um processo conhecido como restituição epitelial que começa quase imediatamente após lesão e não requer proliferação celular.

2.4.6. *Toxoplasma gondii* X Conexina 43

Entre as infecções causadas por parasitas, em especial a toxoplasmose, uma estrutura que merece destaque são as junções celulares (CAMPOS DE CARVALHO *et al.*, 1998). Com diversos mecanismos de escape, o *Toxoplasma gondii* ao entrar na célula causa alterações para facilitar a sua sobrevivência (SEABRA *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstraram alterações no complexo juncional (junções de adesão) em células epiteliais da retina devido a infecção pelo *Toxoplasma gondii*, confirmando

novamente as mudanças na homeostase geradas pelo parasita (NOGUEIRA *et al.*, 2015).

Campos de Carvalho *et al.* (1998) mostraram que a redução da comunicação juncional poderia estar relacionada com alterações secundárias no metabolismo da célula, proporcionado pela infecção com o *Toxoplasma gondii*, portanto o parasita teria a capacidade de exercer influência sobre as junções comunicantes. Mostraram também que astrócitos e células da meninge (aracnoide e pia-máter), apresentavam uma sensível diminuição em seu acoplamento celular e nas marcações para Cx26 e Cx43, quando infectadas pelo *T. gondii*. Contudo, não foi observada uma alteração significativa nos níveis totais de conexina 43, sugerindo então que tal infecção pode modificar o posicionamento da proteína na formação de canais juncionais funcionais na membrana plasmática (CAMPOS DE CARVALHO *et al.*, 1998).

Estudos recentes demonstraram que a infecção com o *T. gondii* leva a perda parcial das microvilosidades na superfície das células Caco-2 (derivada de adenocarcinoma colorretal), durante as avaliações de mudanças morfológicas e fisiológicas. Também foi possível observar diminuição da Claudin-1, Zonula Occludens-1 (ZO-1), e as expressões de ocludina apresentaram padrões descontínuos nas células infectadas. Tais resultados levam a acreditar que a infecção por *Toxoplasma gondii* pode gerar a perda da integridade da mucosa intestinal, levando a um comprometimento da função da barreira e diminuição da resistência elétrica transepitelial em células Caco-2 em 24 horas de infecção, confirmando novamente as mudanças na homeostase geradas pelo parasita (BRICEÑO *et al.*, 2016).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Desta forma, traçamos como **objetivo geral**: Avaliar a modulação das junções comunicantes formadas pela Conexina 43 (Cx43) durante o processo de infecção do *Toxoplasma gondii* na linhagem celular epitelial intestinal IEC-6 e durante o tratamento com TNF- α .

3.2. Objetivo Especifico

Para cumprir o objetivo geral deste estudo, traçamos como **objetivos específicos**:

- Avaliar o crescimento e a morfologia celular de células da linhagem celular epitelial intestinal IEC-6 infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii* ou tratadas com o fator pró-imunoinflamatório TNF- α , por microscopia óptica de contraste de fase;

- Estudar a expressão proteica da Cx43 em células da linhagem celular epitelial intestinal IEC-6 não-infectadas, infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii* ou tratadas com o fator pró-imunoinflamatório TNF- α , por transferência imunoeletrorética;

- Analisar a expressão e a localização da proteína Cx43 em células da linhagem celular epitelial intestinal IEC-6 não-infectadas e infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii*, por imunofluorescência;

4 METODOLOGIA

4.1. Cultura de Células Epiteliais Intestinais (IEC-6)

A linhagem da célula epitelial intestinal (IEC-6) é obtida a partir de células não diferenciadas da cripta do jejuno de *Rattus*, e foi cedida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro, no INMETRO. O plaqueamento das células, foi realizado com uma densidade inicial de 1×10^6 células/mL, em garrafas de plástico de 25 cm² (CORNING / USA), em lamínulas de vidro número 1 (Fisherbrand / Fisher Scientific).

As culturas foram acondicionadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (V/V) (GIBCO), 1UI/mL de insulina (NPH), penicilina 1000UI/mL e estreptomicina 100UI/mL (Sigma- Aldrich). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂.

4.2. Obtenção de Taquizoíta de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos de *T. gondii* (estirpe RH) foram inoculados intraperitonealmente em camundongos suíços (CF-1). Após 2-3 dias, os taquizoítos foram colhidos usando lavagem intraperitoneal com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,3) e depois contados. A forma taquizoíta de *T. gondii* (cepa RH) foi mantida conforme descrito por Padrão *et al.* (2014).

A manutenção dos parasitas ocorreu através do número da CEUA 2108050821 na Universidade do Estado do Rio de Janeiro, campus Zona Oeste (UERJ -ZO).

4.3. Interação Parasito-Célula

As células foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 cm² ou em lamínulas de vidro (número 1) organizadas na placa de 24 poços. Após 48h a cultura atingiu a confluência (Freshney, 2005). O taquizoíta de *T. gondii* foi ressuscitado em meio DMEM e colocado em contato com a célula na proporção 1 parasita para cada célula (1:1), 5 parasitas para cada célula (5:1) e 10 parasitas para cada célula (10:1). Este foi mantido 1 hora em estufa 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi descartado e substituído por DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1UI/mL de insulina e penicilina 1000UI/mL e estreptomicina 100UI/mL e foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂, no período de 24, 48 e 72 horas.

Após, as células foram submetidas a uma avaliação de crescimento celular, e de sua morfologia, por meio de imagens obtidas no microscópio invertido (Axiovert 40 CFL, campo claro, contraste de fase, ZEISS, Alemanha) nos aumentos de 100X e 400X. A contagem de células por campo foi realizada utilizando o programa ImageJ e os dados foram analisados no programa GraphPad Prism para a aquisição do gráfico do número de células.

4.4. Imunofluorescência

As células foram fixadas com formaldeído 4% durante 1h em temperatura ambiente. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS-TRITON X-100R em uma concentração de 0,3%, três vezes durante 30 minutos, e logo em seguida incubadas com albumina sérica bovina (BSA Bovine Serum Albumin, SIGMA) isenta de imunoglobulinas, diluída em PBS a 2% por 20 minutos. Após o bloqueio as células foram incubadas com anticorpo policlonal anti-Cx43 descrito na seção de transferência imunoeletroforética, em uma diluição de 1:100 e deixado over night. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, três vezes por 10 minutos e incubadas com anticorpo secundário ALEXA 488 (na diluição de 1:400 (A-11008, invitrogen). Após a lavagem com PBS, como descrito anteriormente. Em seguida as lamínulas foram incubadas com o marcador de citoesqueleto Faloidina (F-actina) (Alexa Fluor® 546 phalloidin (A22283), Life Technologies) conjugado com o fluorocromo ALEXA 546 em uma diluição de 1:100 por 2 horas. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS três vezes por 10 minutos e incubadas com anticorpo policlonal anti-Cx43 descrito na seção de transferência imunoeletroforética, em uma diluição de 1:100 por 1 horas. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS, três vezes por 10 minutos e foram marcadas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para marcar o núcleo das células. Elas foram montadas sobre lâminas que continham 10 µL de Prolong gold®, uma solução que reduz o decaimento da fluorescência. As marcações nas lâminas foram observadas em um microscópio de epifluorescência AXIOVERT 40 Plus Carl ZEISS (Photo microscope), excitadas com iluminação por lâmpada de mercúrio de alta pressão, HBO 50W, ($\lambda = 490 \text{ nm}$) sendo a emissão monitorada utilizando um conjunto de filtros de emissão para fluorescência de fluoresceína ($\lambda = 525 \text{ nm}$). A especificidade da imunoreatividade foi avaliada na ausência do anticorpo primário. Os experimentos foram submetidos à observação e análise simples ou de secções no plano Z (reconstrução tridimensional) utilizando o

microscópio confocal LSM 710 QUASAR (Carl ZEISS, Oberkochen, Germany). Os dados foram plotados no programa GraphPad Prism para a aquisição do gráfico da análise de distribuição da marcação.

4.5. Determinação da concentração de proteína

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

4.6. Imunoeletrotransferência (Western Blot)

As células estudadas pela técnica de Western Blot foram lavadas e raspadas em uma solução de bicarbonato de sódio, e centrifugadas durante 10min. Foi adicionado 3 mL de Tween 20 e homogeneizado com o auxílio do vórtex. O material foi centrifugado, ressuspenso e armazenado a -20°C em solução de bicarbonato de sódio, com o coquetel de inibidores de proteases (Inibidores de protease: PMSF – 50 mM em etanol; Leupeptina – 5 mg/ml; EDTA - 200 mM; Aprotinina – 10 mg/mL; E-64 – 1 mM; Pepstatina – 1 mg/ml; Antipaina – 10 mM; fenantrolina – 200 mM).

A separação das proteínas presentes na célula foi realizada através da técnica de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). A amostra com as proteínas foi adicionada no gel de corrida (running gel) em uma concentração de 10%.

As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra, e mantidas a temperatura ambiente por cerca de 60 minutos antes de sua aplicação no gel. Após a corrida eletroforética o gel foi colocado em contato com a membrana de nitrocelulose em solução tampão e a transferência realizada sob uma corrente constante de 320 mA por 1 horas (sistema BIO-RAD). A nitrocelulose, foi incubada em tampão TBS (Tris Buffer Saline) contendo leite em pó desnatado Molico® a 5%, e Tween 20 a 0.5% por 30 min, seguindo-se de lavagens com TBS contendo Tween 20 a 0.5% (TBS-T) por 5 vezes durante 5 minutos por vez.

A membrana foi incubada por 17 horas a 4°C sob agitação com anticorpo policlonal anti-conexina43 (Anti-connexin43/ GJA1 antibody (ab11370)(Abcam)) diluído na proporção de 1:1000 em TBS-T contendo leite em pó desnatado Molico® a 3%. Após a lavagem da nitrocelulose com TBS-T ela foi incubada com anticorpo secundário diluído na proporção de 1:5000 em TBS-T contendo leite em pó desnatado Molico® a 3%, este está ligado a horseradish peroxidase para quimioluminescência, por 2 horas. Para revelação a nitrocelulose foi incubada com a solução de ECL (Substrato de peroxidase para quimioluminescência) acrescentada a Peróxido para análise no sistema ChemiDoc MP imaging system BIO-RAD, e avaliado através do programa Image lab 5.2.1.

4.7. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 9.3.1. Os testes Qui-quadrado e One Way Anova foram utilizados para a análise inferencial em um nível de significância inferior a 0,05.

5 RESULTADOS

5.1. Infecção com o parasita *Toxoplasma gondii*: Crescimento Celular e Aspectos Morfológicos

A linhagem epitelial intestinal IEC-6 foi infectada na proporção de 1 parasita por célula, 5 parasitas por célula e de 10 parasitas por célula a fim de analisar como o crescimento celular e os aspectos morfológicos celulares podem ser alterados em um microambiente de infecção aguda, gerado pelo parasita *T. gondii* durante 24, 48 e 72 horas de incubação com as células.

As características do microambiente, relacionadas com a contagem do número de células, podem ser observadas nas figuras 19, 21 e 23 no aumento de 100X, enquanto as alterações morfológicas nas células da linhagem IEC-6 são observadas em um aumento 400X nas figuras 20, 22 e 24.

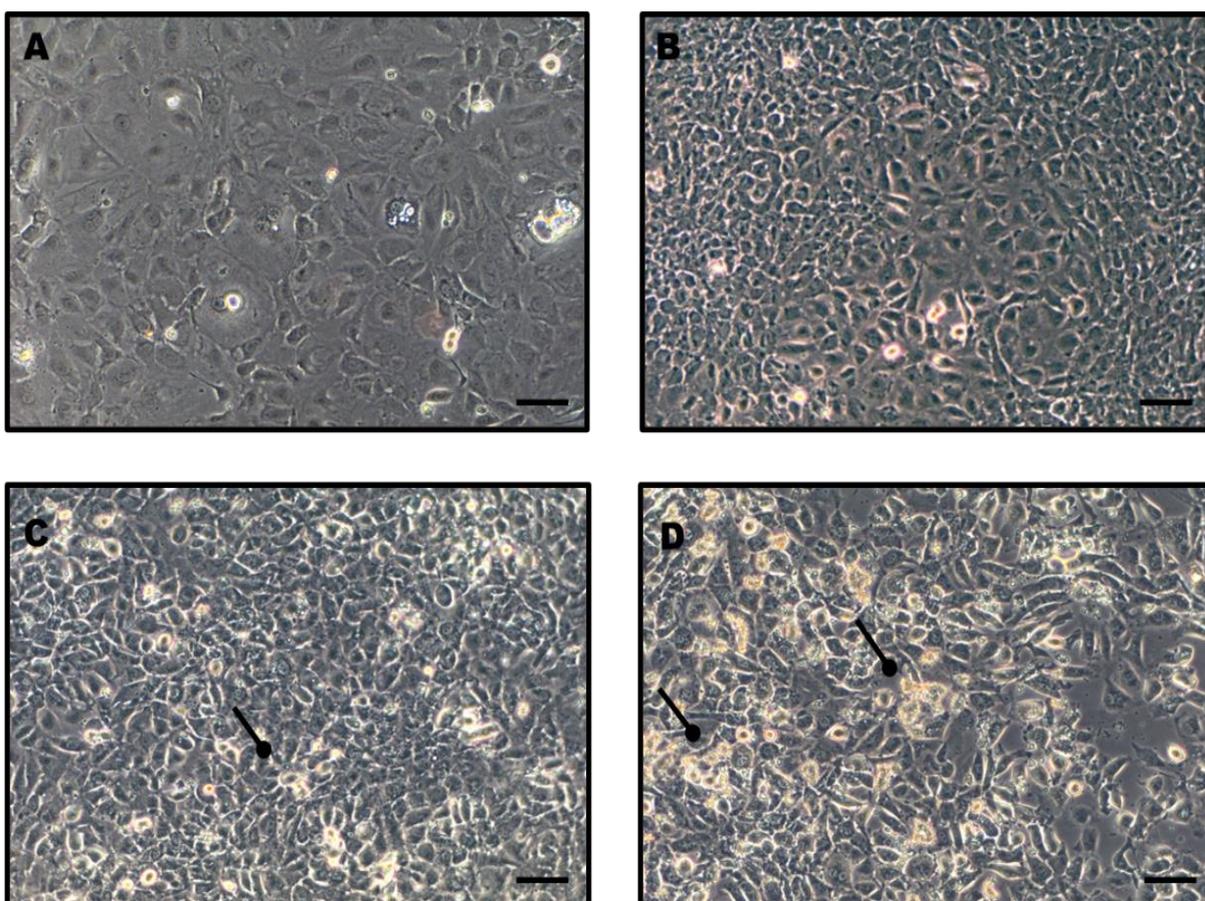
No início do processo de infecção as alterações no microambiente são sutis, entretanto com o aumento do tempo de incubação a quantidade de parasitas aumenta, levando ao aumento do dano celular e a morte de células.

Nestes resultados acompanhamos a progressão das alterações celulares que ocorrem no processo de infecção, envolvendo a manutenção da sobrevivência do parasita no meio intracelular, comparadas sempre com as células controle (sem parasita).

Nas figuras 19 e 20 há a comparação entre o microambiente e as alterações morfológicas em 24 horas de infecção destacando o aumento sutil de morte celular. Por outro lado, nas figuras 21 e 22 essa mesma comparação é feita em 48 horas de infecção destacando a diferença do microambiente entre as concentrações de infecção, e por fim as figuras 22 e 23 marcam o limite de tempo para a manutenção da cultura infectada, estando esta com 72 horas, demonstrando uma redução do número de células em cultura.

É possível destacar que a alteração do comportamento das células em relação a sua ocupação no microambiente e alterações morfológicas nas células IEC-6 fica evidente com a progressão do tempo, e se tornam presentes em todos os horários avaliados, quando comparadas com as células controle.

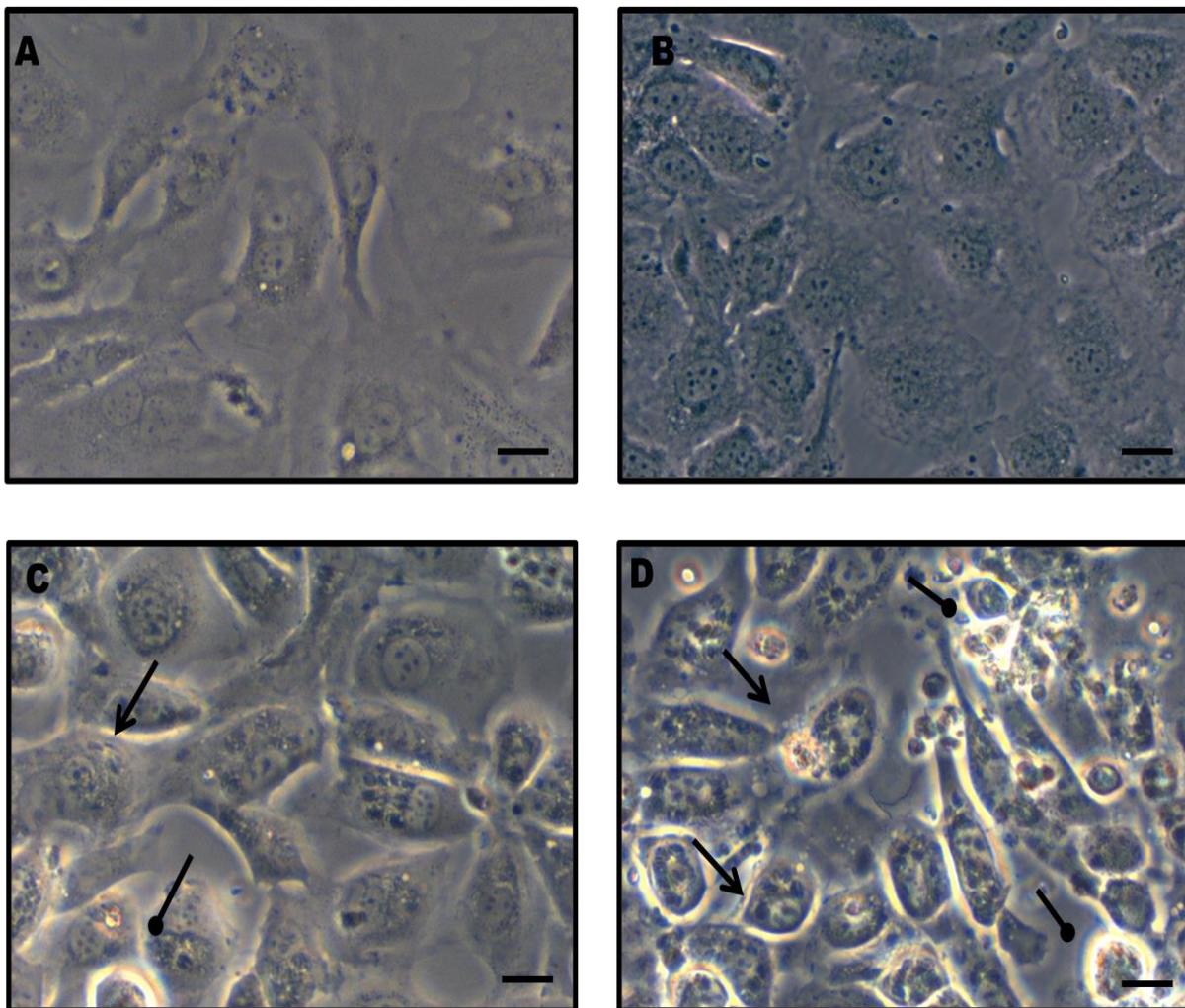
Figura 19 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 24 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (10x)



Comparação das células controle (A) com as células infectadas com o *Toxoplasma gondii* na proporção de 1:1 (B), 5:1 (C) e 10:1(D) (parasitas por célula). É possível visualizar a alteração do comportamento das células em relação a sua ocupação e morte celular no microambiente, quando comparadas com

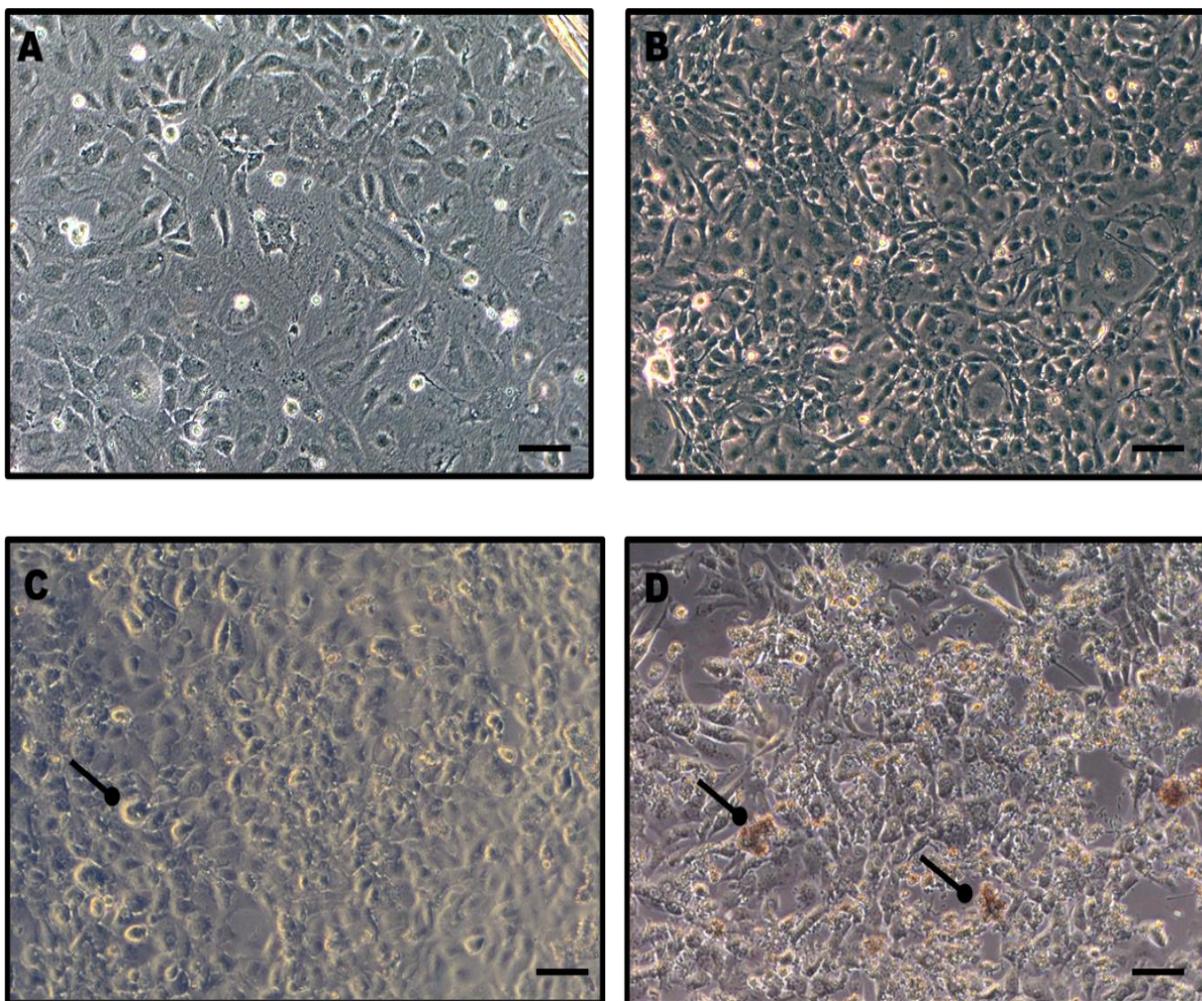
as células controle em ambas as proporções de infecção, sendo mais evidente na proporção 10:1 (C). Seta em elipse indicando a morte celular. Aumentos em objetiva de 10X.

Figura 20 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 24 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (40x)



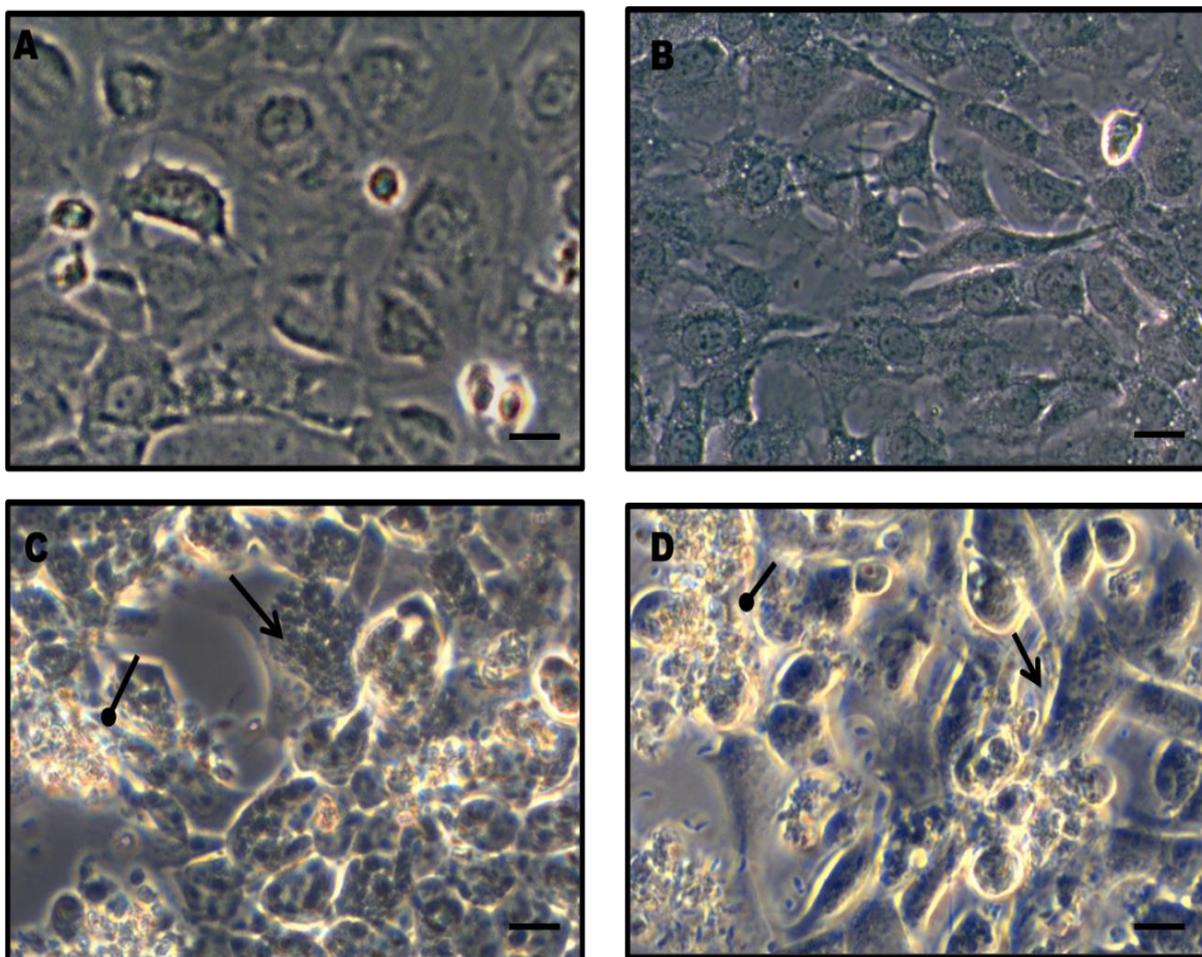
Comparação das células controle (A) com as células infectadas com o *Toxoplasma gondii* na de proporção 1:1 (B), 5:1 (C) e 10:1(D) (parasitas por célula). É possível visualizar a alteração na morfologia com células mais turgidas e o começo do desprendimento das células indicando o início da morte celular, quando comparadas com as células controle em ambas as proporções de infecção, sendo mais evidente na proporção 10:1 (C). Seta aberta indicando as alterações morfológicas e setas em elipse indicando a morte celular. Aumentos em objetiva de 40X.

Figura 21 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 48 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (10x)



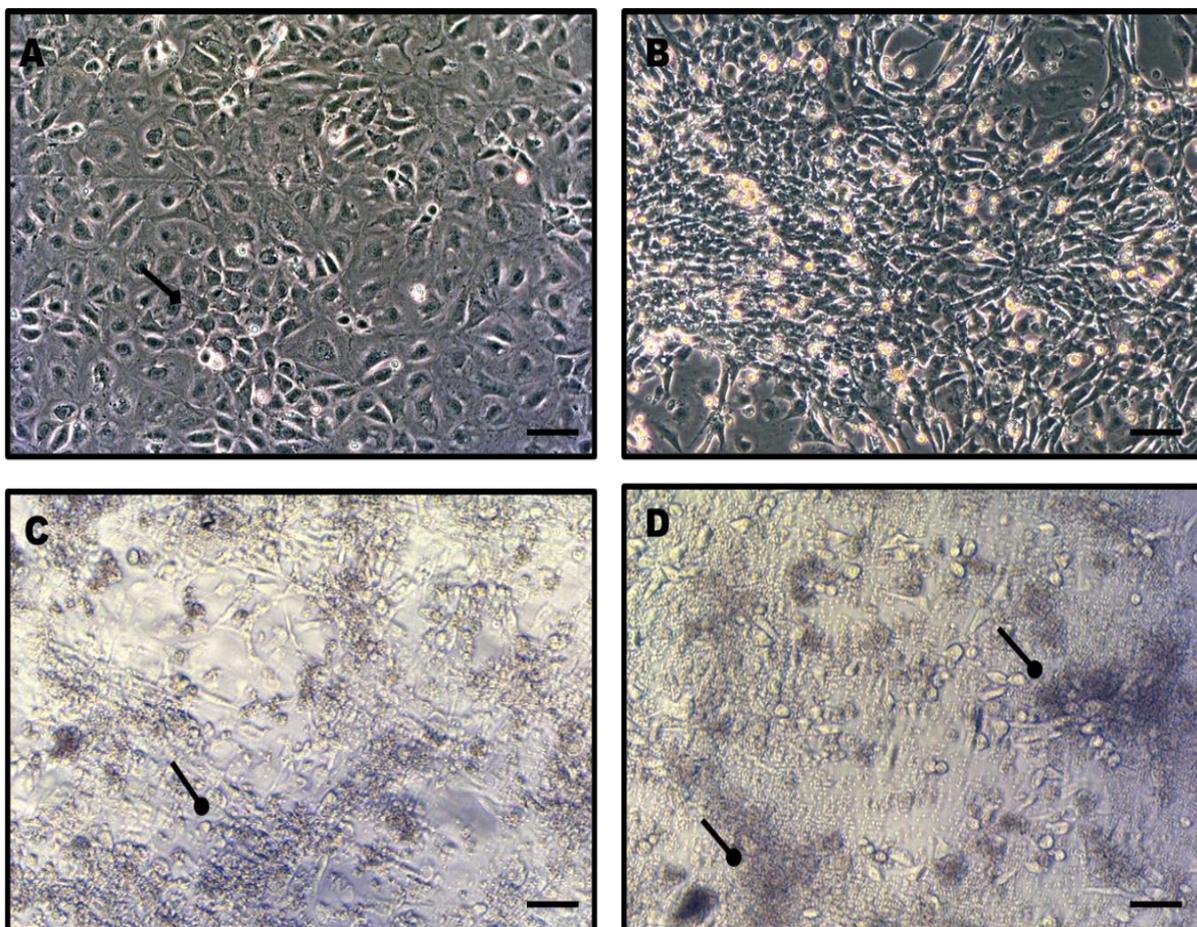
Comparação das células controle (A) com as células infectadas com o *Toxoplasma gondii* na de proporção 1:1 (B), 5:1 (C) e 10:1(D) (parasitas por célula). Observa-se o aumento no número de células em B e C devido ao crescimento celular, entretanto em D temos o aumento da morte celular pelo grande número de parasitas. Seta em elipse indicando a morte celular. Aumentos em objetiva de 10X.

Figura 22 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 48 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (40x)



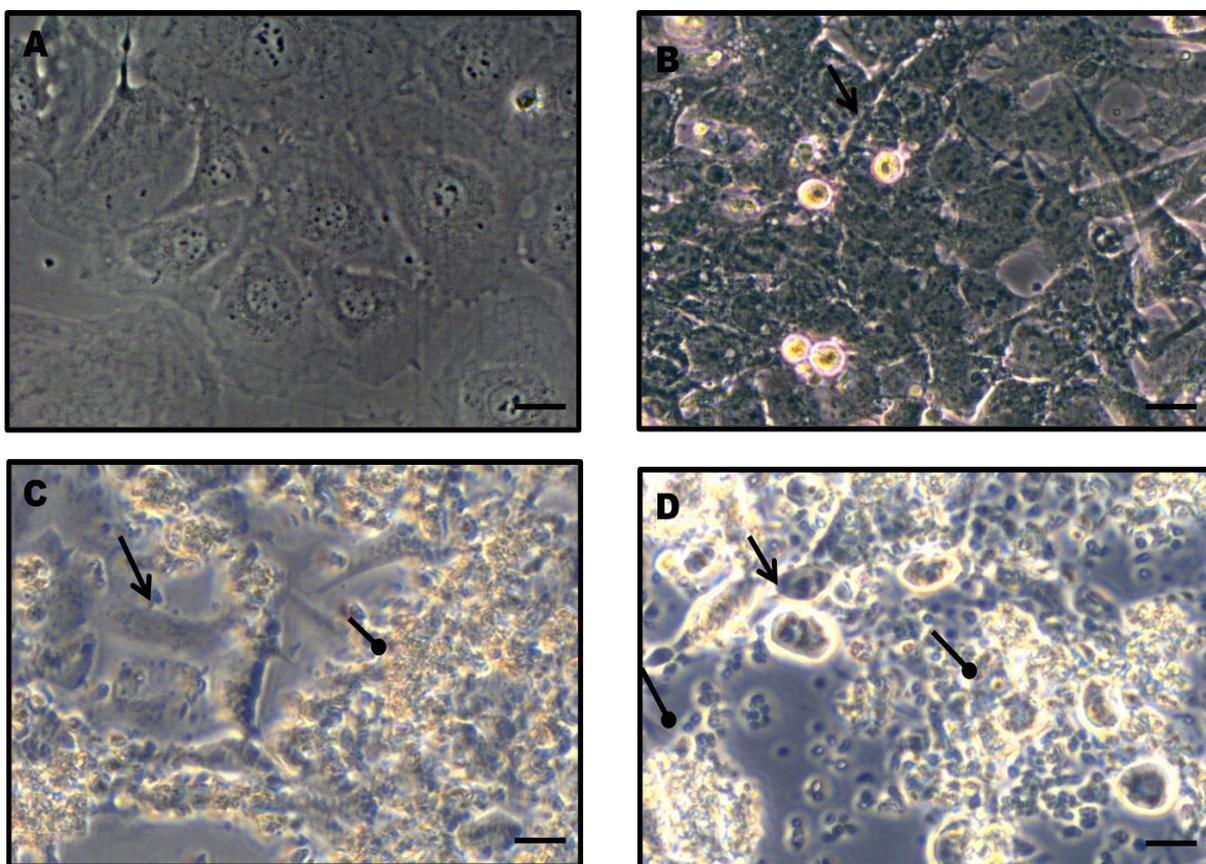
Comparação das células controle (A) com as células infectadas com o *Toxoplasma gondii* na de proporção 1:1 (B), 5:1 (C) e 10:1(D) (parasitas por célula). É possível visualizar a morfologia da célula com padrões descontínuos devido ao aumento dos parasitas intracelulares e uma grande quantidade de células mortas, quando comparadas com as células controle em ambas as proporções de infecção. Seta aberta indicando as alterações morfológicas e setas em elipse indicando a morte celular. Aumentos em objetiva de 40X.

Figura 23 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 72 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (10x)



Comparação das células controle (A) com as células infectadas com o *Toxoplasma gondii* na de proporção 1:1 (B), 5:1 (C) e 10:1(D) (parasitas por célula). Em A temos o aumento do número de células pela continuidade do ciclo celular (seta em losango), já em C e D temos o aumento da morte celular pelo grande número de parasitas, sendo que, em B e C observamos um microambiente com mais células viáveis quando comparamos com D. Seta em losango mostrando o aumento no número de células e setas em elipse indicando a morte celular. Aumentos em objetiva de 10X.

Figura 24 - Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após 72 horas de infecção utilizando células da Linhagem IEC-6 (40x)



Comparação das células controle (A) com as células infectadas com o *Toxoplasma gondii* na de proporção 1:1 (B), 5:1 (C) e 10:1(D) (parasitas por célula). É possível visualizar a morfologia celular completamente alterada em ambas as proporções e uma grande quantidade de células mortas, quando comparadas com as células controle e também é possível observar o aumento do parasita extracelular devido a lise das células infectadas, sendo mais evidente na proporção 5:1 (C) e 10:1 (D). Setas abertas indicando as alterações morfológicas e setas em elipse indicando a morte celular. Aumentos em objetiva de 40X.

5.2 Tratamento da IEC-6 com TNF- α : Crescimento Celular e Aspectos Morfológicos

A linhagem epitelial intestinal IEC-6 foi tratada com Fator de Necrose Tumoral do Tipo α (TNF- α) na concentração de 1 ng/mL a fim de analisar como o crescimento celular e os aspectos morfológicos celulares são alterados em um microambiente durante 24, 48 e 72 horas de tratamento. As características do microambiente podem ser observadas na figura 25 na objetiva de 10X e as alterações morfológicas nas células IEC-6 são observadas com o aumento na objetiva de 40X na figura 26.

Nestes resultados foi identificada uma pequena alteração no microambiente, ocasionada pela tendência ao aumento no número de células que ocorre durante o tratamento com o fator de necrose tumoral (TNF- α), observado nos horários de 24 e 48h, quando comparado com o controle (figura 25A).

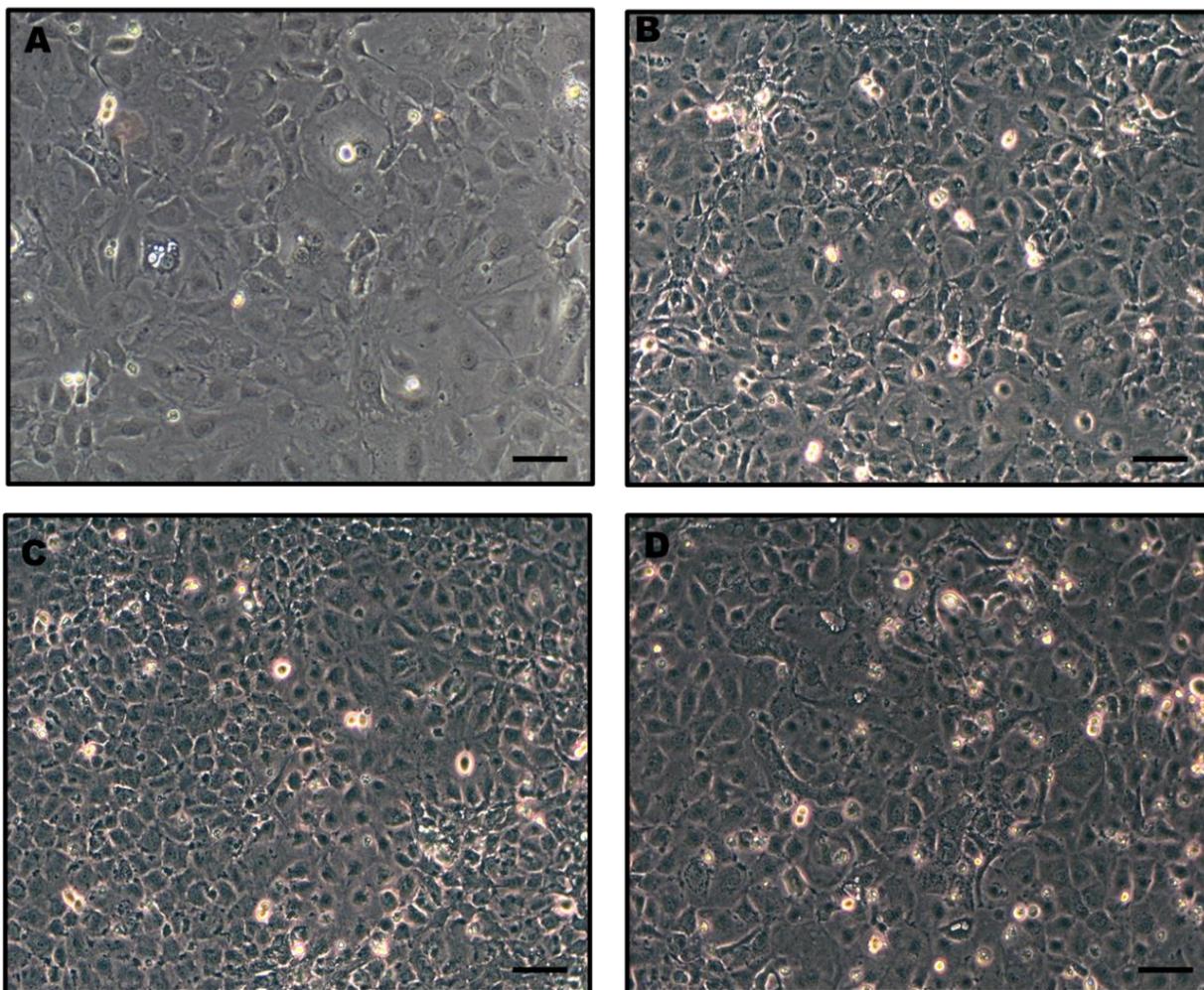
Já as alterações morfológicas são pouco evidentes, podendo ser mais bem observadas no horário de 48h de tratamento (figura 26C). Destacando que a alteração do comportamento das células em relação a sua ocupação no microambiente e alterações morfológicas nas células IEC-6 tratadas são sutis quando comparadas com as células controle.

O gráfico da contagem do número de células por campo das culturas da Linhagem Celular IEC-6 (figura 27), foi feito a fim de comparar as células controle com as células tratadas com TNF- α e as células infectadas com o *Toxoplasma gondii* nas três proporções de infecção (1:1, 1:5 e 1: 10 célula por parasitas) em períodos de 24, 48 e 72 horas.

A avaliação do gráfico mostrou que nem todos os dados analisados apresentaram diferença significativa, entretanto a cultura em 24h de tratamento com TNF- α apresentou um aumento no número de células quando comparado com o controle. Esse aumento no número de células ficou ainda mais evidente após 48h de tratamento.

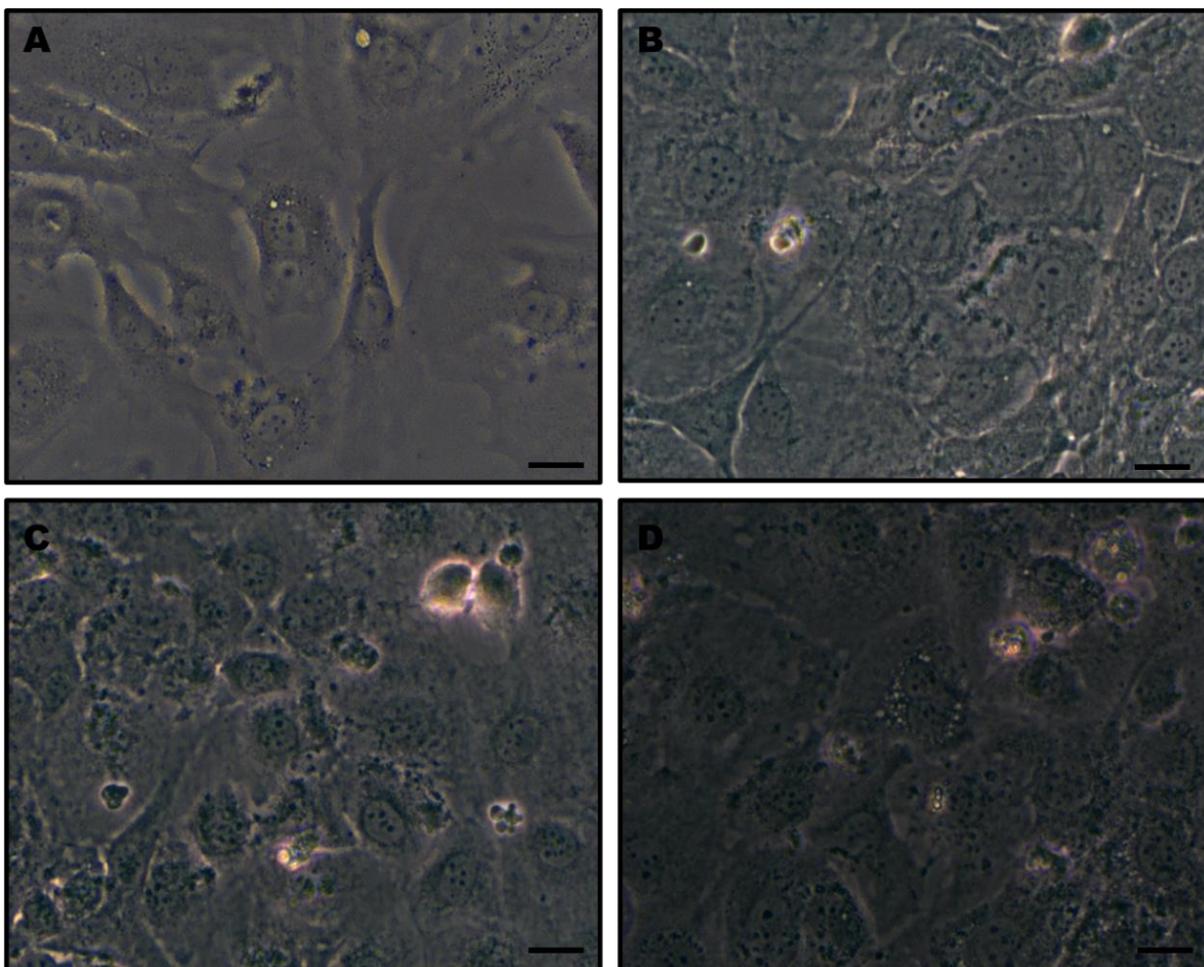
Destaca-se também que a ativação dessas células promovidas pelas alterações no microambiente causadas pelo parasita refletiu também no número de células em cultura. Nos horários iniciais da infecção se tem o aumento significativo de células no microambiente, entretanto esses valores tendem a decair com o aumento da parasitemia e maior proporção de infecção. A redução do número de células em 72h de infecção em relação aos horários anteriores foi evidente em todas as proporções analisadas. As culturas infectadas com 10 parasitas por células demonstraram redução ainda mais significativa do número de células em 72h de interação célula-parasita, já que essa proporção de infecção (10:1) tem um decréscimo do número de células a partir no primeiro horário avaliado.

Figura 25 – Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após tratamento com TNF- α utilizando células da Linhagem IEC-6 (10x)



Comparação das células controle (A) com as células tratadas com TNF- α nos horários de 24h (B), 48h (C) e 72h (D). É possível visualizar as sutis alteração do comportamento das células em relação a sua ocupação no microambiente, quando comparadas com as células controle em todos os horários de tratamento, sendo evidenciado pelo aumento no número de células. Aumentos em objetiva de 10X.

Figura 26 – Micrografias em microscopia óptica de contraste de fase após tratamento com TNF- α utilizando células da Linhagem IEC-6 (40x)



Comparação das células controle (A) com as células tratadas com TNF- α nos horários de 24h (B), 48h (C) e 72h (D). É possível visualizar poucas alterações morfológicas nas células, quando comparadas com as células controle em todos os horários de tratamento, sendo mais evidente em 48h de tratamento (C). Aumentos em objetiva de 40X.

Figura 27 – Contagem de células

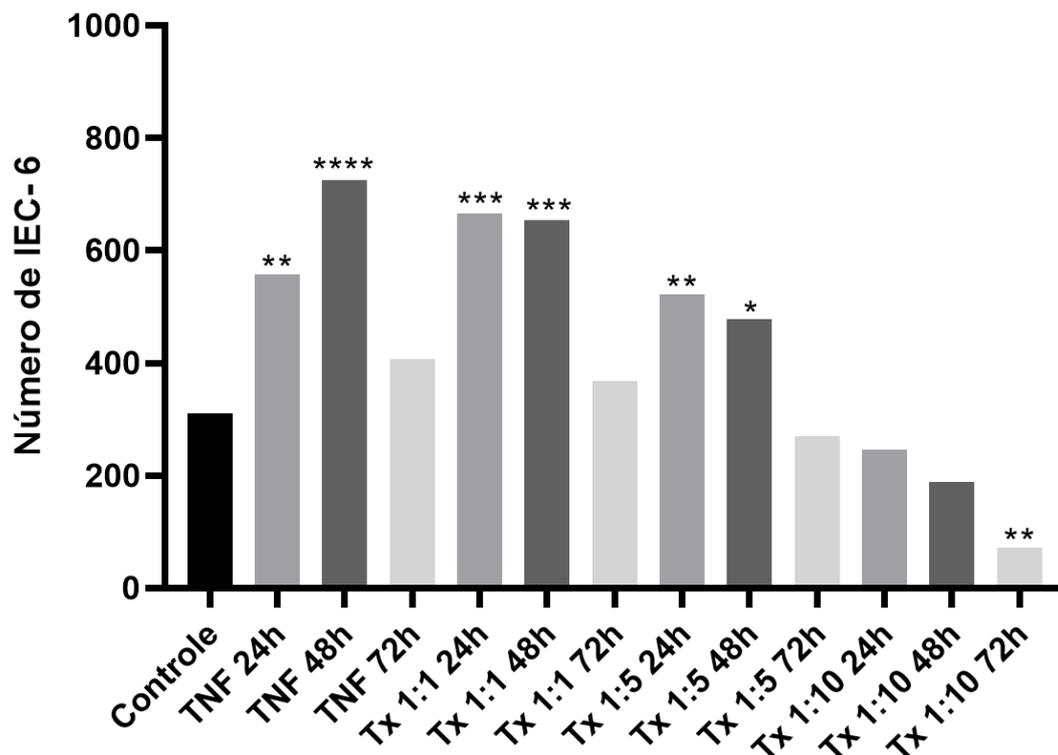


Gráfico comparativo do número de células por campo das culturas da Linhagem Celular IEC-6 controle, após o tratamento com TNF- α e após a infecção com *Toxoplasma gondii* nas três proporções de infecção (1:1, 1:5 e 1:10 célula por parasitas) em períodos de 24, 48 e 72 horas. P<0,05 (*); P<0,01(**), P<0,001(***); P<0,0001(****)

5.3 Infecção com *Toxoplasma gondii* + Tratamento com TNF- α : Expressão da Conexina 43.

Através de ensaios de imunoeletrortransferência (Western Blot), utilizando células IEC-6, foi analisada a expressão dos níveis proteicos da conexina 43 nas células controle, infectadas (*T. gondii* 1:1) e tratadas (TNF- α 1ng/mL) nos horários de 24, 48 e 72 horas. Foi possível observar a expressão da Cx43 não somente nas células controle, como também nas células infectadas e nas tratadas em todos os tempos de incubação analisados no experimento (24, 48 e 72 horas), como destacado na figura 28A.

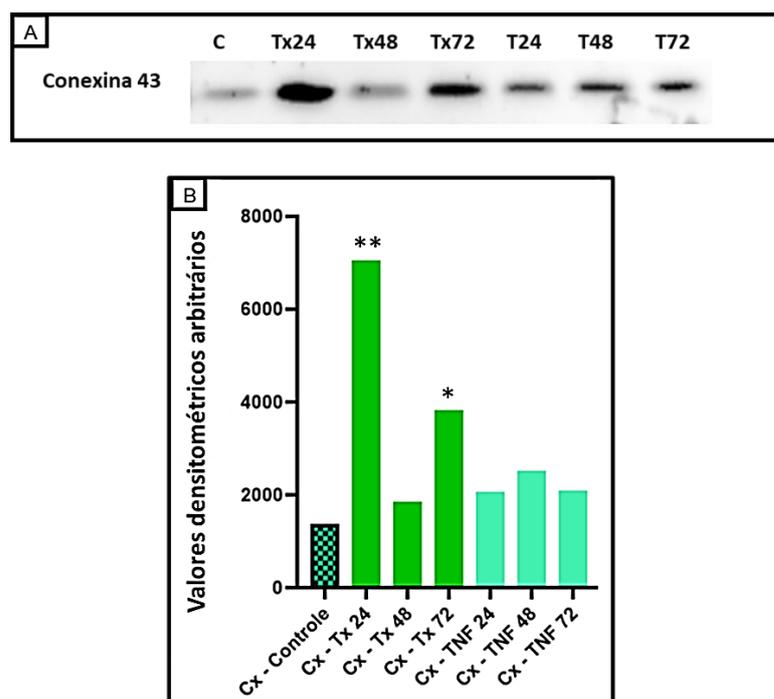
Diante dos achados, a banda representando a amostra em que houve interação com o parasita por um período de incubação de 24 horas apresentou uma maior expressão de Cx43, quando comparada com as células controle (não infectadas), com as células infectadas em outros momentos, e também em relação aos demais tempos

de tratamento com fator pró-imunoinflamatório, como pode ser observado na figura 28A.

Com 72 horas de infecção com o *T. gondii*, a expressão da proteína Cx43 também se mostrou com valores maiores do que os encontrados nas células controle, no entanto com valores menores do que os encontrados em 24 horas de infecção.

A expressão da Cx43 nas células tratadas com TNF- α analisadas no experimento (24, 48 e 72 horas), não mostraram variações significativas quando comparadas com as células controle. Como visto na figura 25B e no gráfico da figura 27 o TNF- α conseguiu promover o aumento no número de células, principalmente em 48h de tratamento, contudo este dado não interferiu estatisticamente de forma significativa na expressão da Conexina 43 na célula.

Figura 28 – Imunoeletrotransferência da linhagem IEC-6



Experimentos representativos de Imunoeletrotransferência de culturas de linhagem IEC-6. Em A os níveis de expressão da proteína Conexina 43. Os poços foram organizados da seguinte forma: Células Controle (C); Célula infectada com *Toxoplasma gondii* na concentração de 1:1 nos períodos de 24, 48 e 72 horas (Tx24, Tx48 e Tx72); e Tratadas com TNF- α 1ng/mL nos períodos de 24, 48 e 72 horas (T24, T48 e T72). A marcação em 43 kDa é resultado da utilização do anticorpo policlonal para a Conexina 43. Nota-se o aumento da expressão da Cx43 em relação as células IEC-6 controle, em relação às células IEC-6 infectadas, principalmente quando analisado o período de 24 horas de infecção. As células tratadas com fatores pró-imunoinflamatórios não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis expressos de Cx43, quando comparadas com as células

controle. O gráfico (B) representa a densitometria feita a partir das marcações das bandas observadas na imagem do Western blot de culturas das células IEC-6. A figura 28B demonstra que em 24h e 72h de infecção ocorreu o aumento estatisticamente significativo da expressão da Conexina 43. $P < 0,05$ (*); $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***); $P < 0,0001$ (****)

5.4 Imunofluorescência da Linhagem Celular IEC-6

A linhagem celular epitelial intestinal (IEC-6) foi submetida à técnica de imunofluorescência, e analisada por microscopia confocal, a fim de avaliar o perfil do posicionamento morfofuncional da conexina 43 em seu microambiente, assim como no ambiente em que ocorreu a infecção parasitária com o *Toxoplasma gondii*, na proporção de dez parasitas por célula, durante 24, 48 e 72 horas de infecção, sendo comparadas com as células controle.

Em todas as micrografias a linhagem IEC-6 foi incubada com o marcador DAPI a fim de destacar o núcleo celular (em azul), marcada com o anticorpo anti-conexina 43 para indicar a presença e distribuição da conexina 43 (em verde), e incubada com Faloidina para que os filamentos de F-actina fossem demonstrados (em vermelho).

Ao realizar a análise do experimento, verificou-se a marcação do núcleo da célula controle (não infectada) com DAPI (figura 29A), e os filamentos de F-actina organizados uniformemente por todas as células, sendo a marcação mais evidente nas proximidades da membrana plasmática (figura 29B).

Na figura 29C, a marcação para conexina 43 aponta que esta proteína está localizada na membrana plasmática da célula, sua localização morfofuncional que indicaria a possível manutenção de sua atividade de comunicação juncional. Nesta mesma micrografia é possível evidenciar a formação de placas juncionais.

Na figura 30, foi realizada a imunomarcação na linhagem IEC-6 infectada pelo parasita no período de 24 horas, a fim de estudar as mesmas estruturas descritas anteriormente. Na figura 30A é possível observar a marcação do núcleo das células IEC-6, bem como o núcleo dos parasitas presentes no interior das células. Ao analisar o citoesqueleto celular, é possível destacar o início de um processo de desorganização dos filamentos de F-actina (figura 30B), e a redução da marcação para conexina 43 na membrana plasmática (figura 30C).

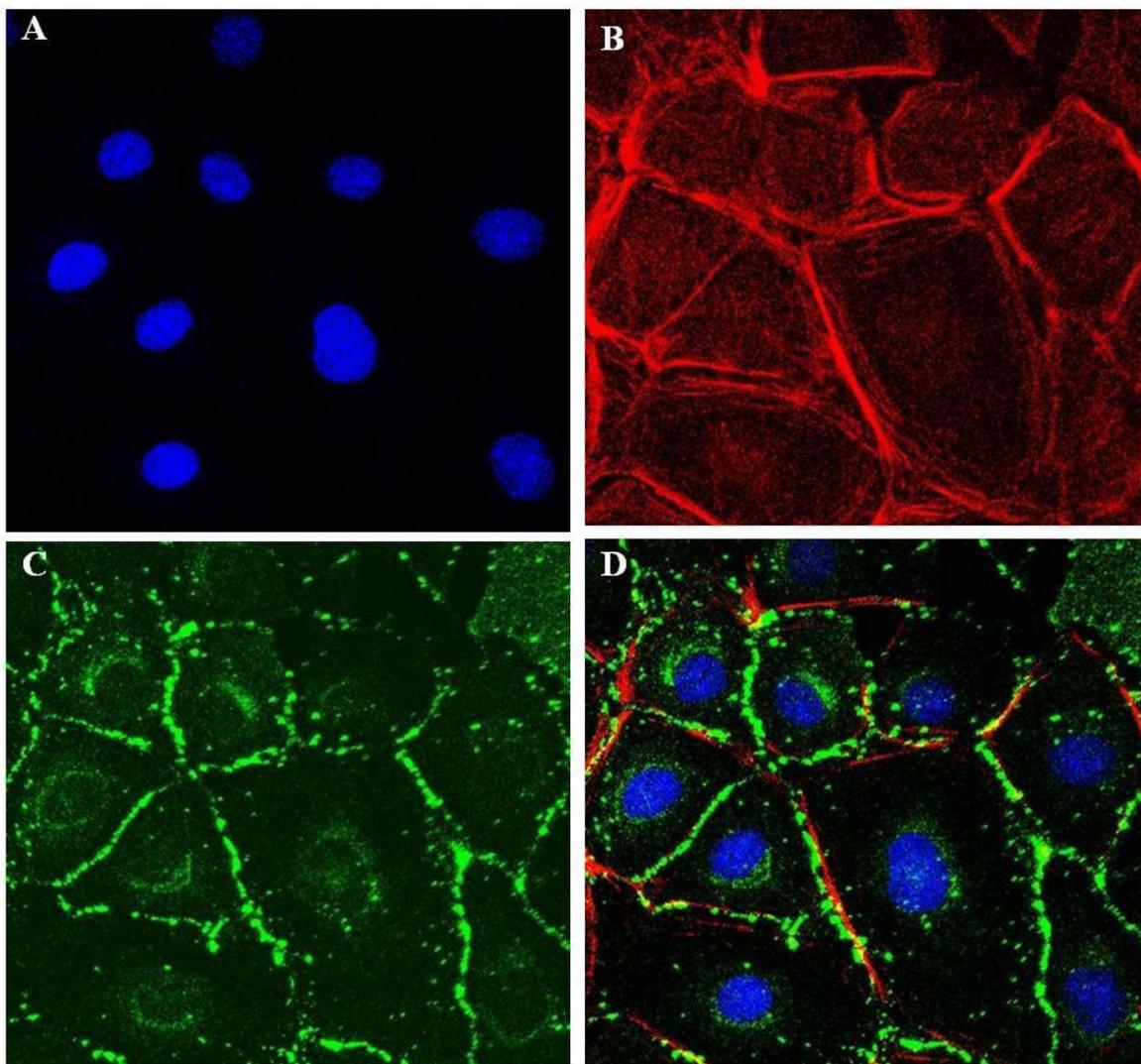
No período de 48 horas de infecção (figura 31), o núcleo das células da linhagem IEC-6, e dos parasitas, continuam marcados pelo DAPI (figura 31A) de forma inalterada, porém o citoesqueleto das células apresenta uma maior desorganização

quando comparado às células controle e às células infectadas por 24 horas (figura 30B). Entretanto, a marcação para a proteína conexina 43 na membrana plasmática, bem como no citoplasma, encontra-se aumentada (figura 31C) quando comparado com as 24 horas de infecção com o parasita.

Na figura 32, foi analisado o processo de infecção pelo período de 72 horas, se mostrando evidente a desorganização dos filamentos de F-actina e a marcação do citoesqueleto dos protozoários no interior das células (figura 32B). Neste contexto, a marcação para a proteína conexina 43 na membrana plasmática encontra-se significativamente reduzida, e praticamente inexistente no citoplasma (figura 32C). Por outro lado, a marcação do núcleo das células IEC-6 e a expressiva quantidade do núcleo dos parasitas no interior das células (figura 32A) se faz presente.

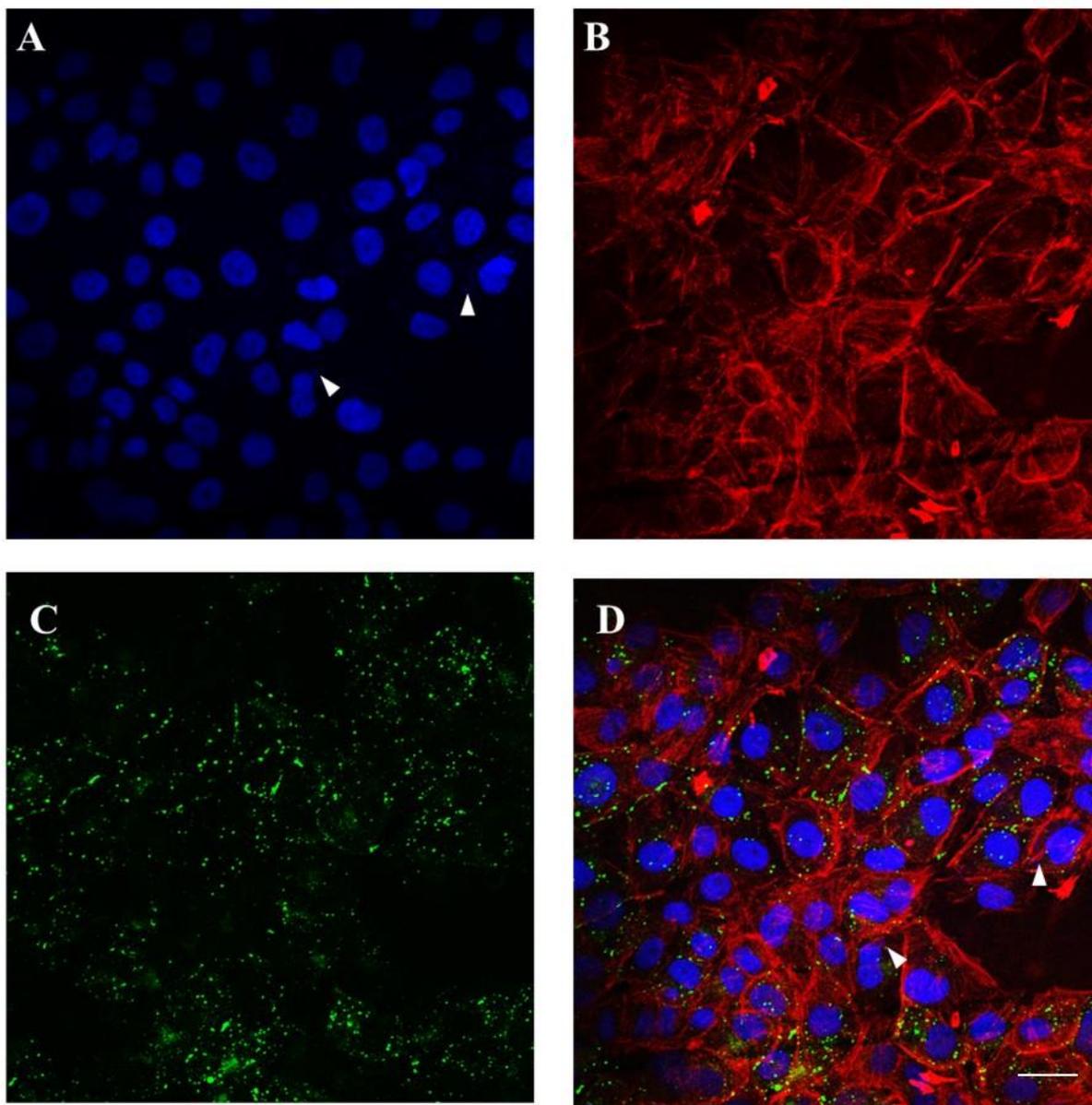
Na figura 33 é demonstrada a representação gráfica da análise de imunofluorescência confocal mostrando a porcentagem da área marcada pelos anticorpos anti-conexina 43 (verde) e faloidina (vermelho) sobre a área total da imagem, juntamente com a análise estatística dos dados corroborando com os achados de imunofluorescência. Foi notório que, após o decréscimo da marcação para conexina 43 em 24, em 48h de infecção ocorreu o aumento significativo da área marcada com o anticorpo anti-Cx43, quando comparado com o controle. Já a significância dos resultados de 72h também foi comprovada, portanto ocorreu uma diminuição significativa da marcação 43 nas células com o aumento da parasitemia. A marcação dos filamentos de F-actina pela faloidina também foram avaliados e comparados com o controle. Foi possível observar a diminuição da marcação desses filamentos a medida que aumentava o tempo de infecção, entretanto com 72h de infecção é notório o aumento significativo dessa marcação dos filamentos de F-actina devido ao grande dano celular, fazendo com que o citoesqueleto do protozoário também fosse marcado.

Figura 29 - Imunofluorescência do controle da linhagem IEC-6



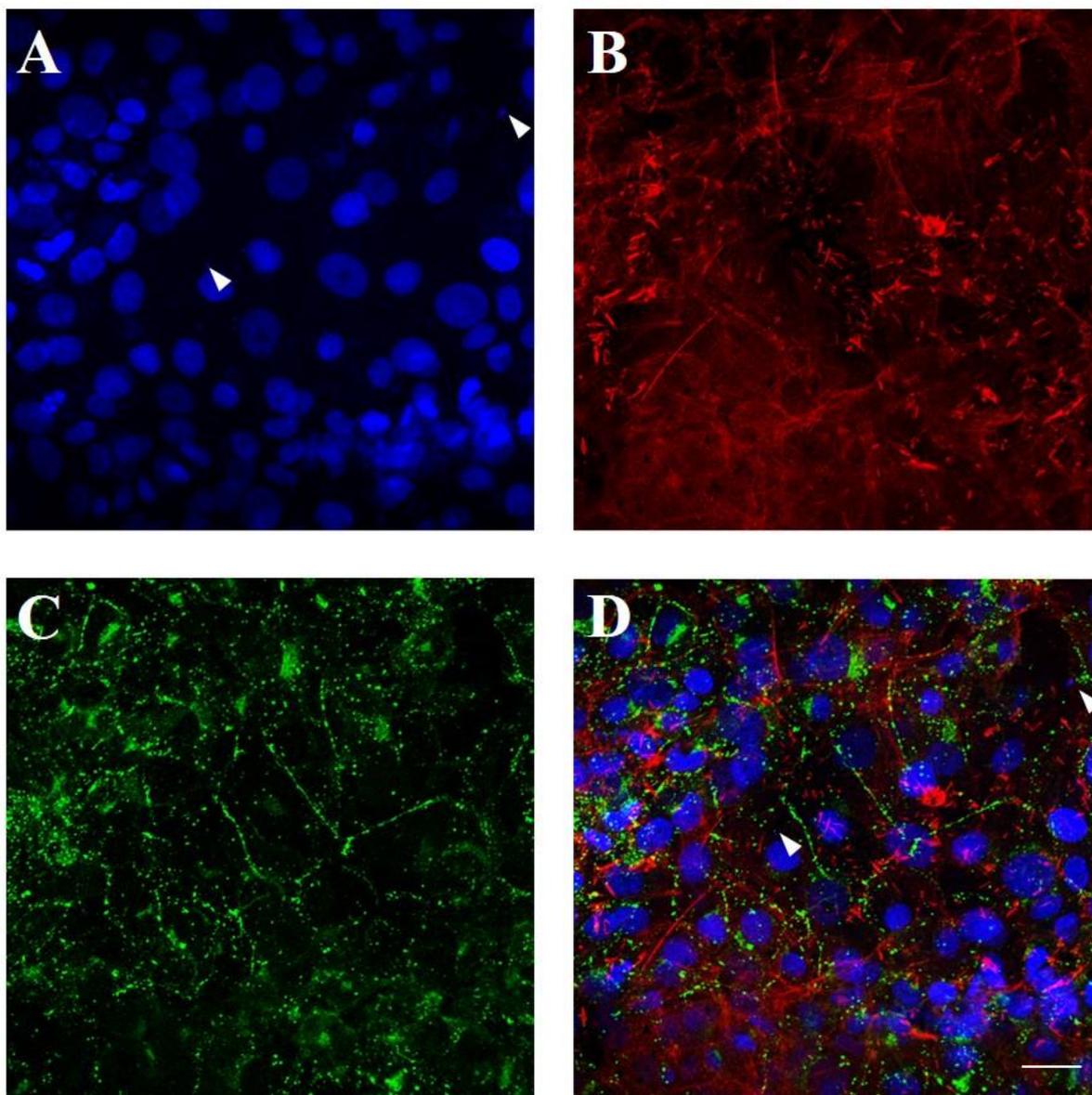
Imunofluorescência da célula controle demonstrada em microscopia confocal (LSM710, Zeiss, Germany). Observamos que o núcleo das células é marcado com DAPI em azul (A) e a marcação dos filamentos de F-actina pela faloidina em vermelho e da conexina 43 em verde, localizado na membrana plasmática e no citoplasma celular (respectivamente B e C). Na micrografia D é demonstrado as imagens sobrepostas. Imagens obtidas na objetiva de 63X.

Figura 30 - Imunofluorescência da linhagem IEC-6 com 24h de infecção com *Toxoplasma gondii*



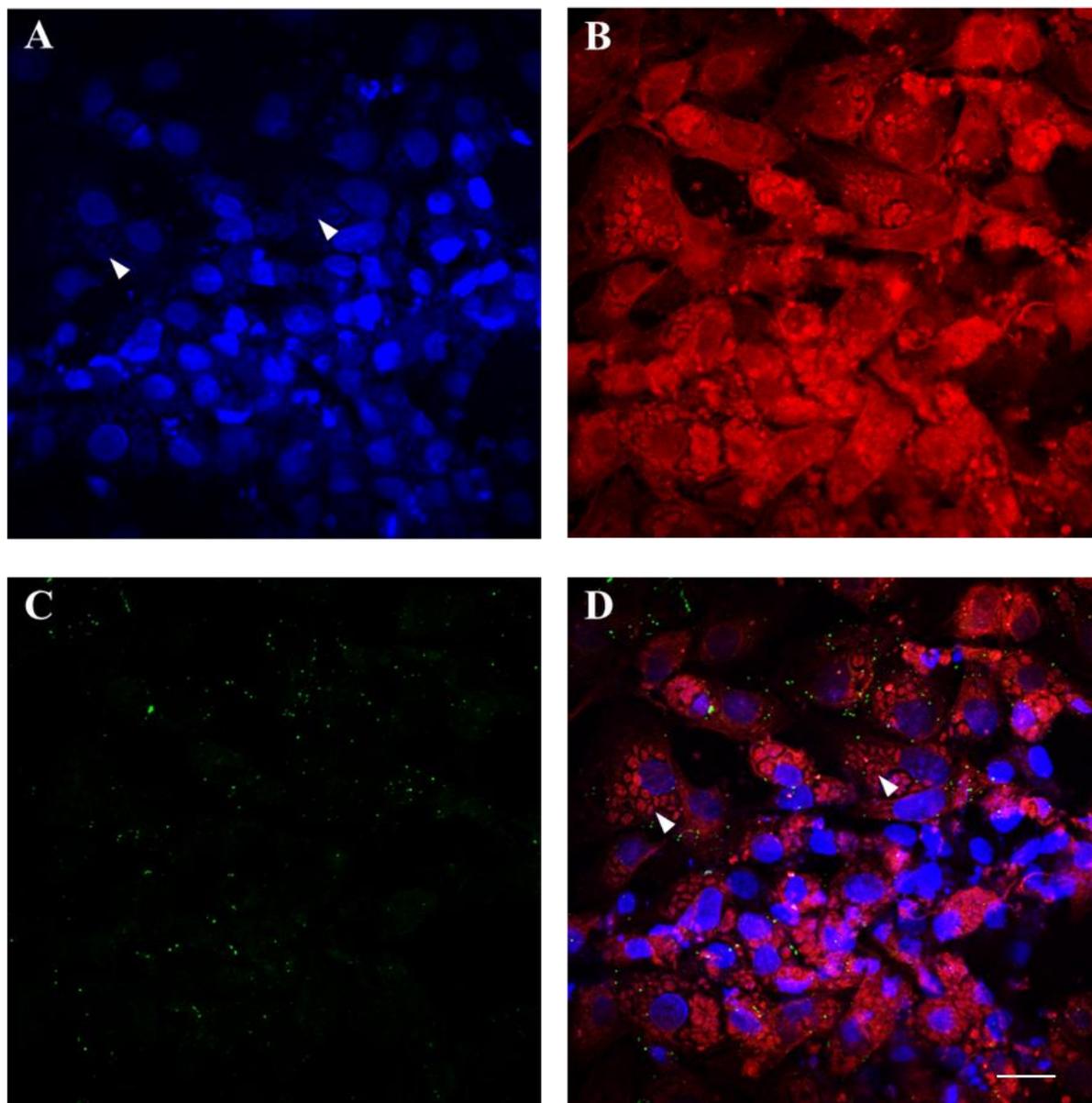
Imunofluorescência demonstrada em microscopia confocal (LSM710, Zeiss, Germany), indicando a marcação para a proteína conexina 43 e faloidina (marcador dos filamentos de F-actina) na linhagem celular IEC-6 infectada com *Toxoplasma gondii*, na proporção 10:1 (dez parasitas para uma célula), após 24 horas. Em setas, A e D demonstraram infecção pelo parasita. Neste experimento, a Conexina 43 foi reduzida da membrana plasmática das células IEC-6 após a infecção (C) quando comparada ao controle. Na micrografia D é demonstrada a interposição de imagens. Barra de calibração: 50 μ m.

Figura 31 - Imunofluorescência da linhagem IEC-6 com 48h de infecção com *Toxoplasma gondii*



Imunofluorescência demonstrada em microscopia confocal (LSM710, Zeiss, Germany), indicando a marcação para a proteína conexina 43 e faloidina (marcador dos filamentos de F-actina) na linhagem celular IEC-6 infectada com *Toxoplasma gondii*, na proporção 10:1 (dez parasitas para uma célula), após 48 horas. Em setas, A e D demonstraram a infecção pelo parasita. Neste experimento, a faloidina (B) mostra a desorganização dos filamentos de F-actina do citoesqueleto celular e a conexina 43 (C) foi aumentada da membrana plasmática das células IEC-6 após a infecção quando comparada ao controle. Na micrografia D é demonstrada a interposição de imagens. Barra de calibração: 50 μ m

Figura 32 - Imunofluorescência da linhagem IEC-6 com 72h de infecção com *Toxoplasma gondii*



Imunofluorescência demonstrada em microscopia confocal (LSM710, Zeiss, Germany), indicando a marcação para a proteína conexina 43 e faloidina (marcador dos filamentos de F-actina) na linhagem celular IEC-6 infectada com *Toxoplasma gondii*, na proporção 10:1 (dez parasitas para uma célula), após 72 horas. Em setas, A e D demonstraram infecção pelo parasita. Nesse experimento, a marcação da conexina 43 e F-actina foram interrompidas, pela infecção, da membrana plasmática das células IEC-6 (B, C). Na micrografia D é demonstrado imagens interpostas. Barra de calibração: 50 μ m.

Figura 33 - Análise de distribuição

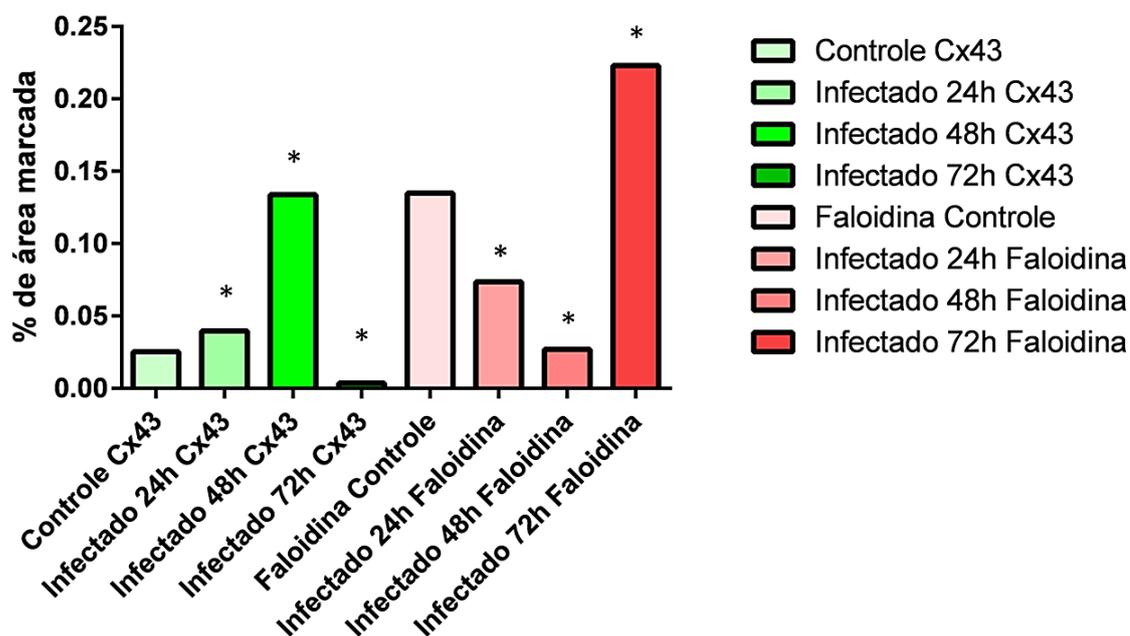


Gráfico da análise de imunofluorescência confocal mostrando a porcentagem da área marcada pelos anticorpos anti-conexina 43 (verde) e faloidina (vermelho) sobre a área total da imagem. É possível observar que em 48h de infecção com o protozoário *Toxoplasma gondii* se tem o aumento da área marcada com o anticorpo anti-Cx43 e essa marcação diminui de forma estatisticamente significativa após 72h de infecção. Ao analisar a marcação dos filamentos de F-actina pela faloidina é notório o decréscimo da estrutura de acordo com o aumento da parasitemia, contudo em 72h de infecção é possível visualizar o aumento dessa marcação devido ao grande dano celular, fazendo com que o citoesqueleto do protozoário também fosse marcado. $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

6.1 Células do Epitélio Intestinal: Alterações da Morfologia e do Crescimento Celular em Microambientes Modificados

6.1.1. Alterações Celulares na Parasitemia

O *Toxoplasma gondii* é um patógeno parasitário transmitido principalmente através do consumo oral de alimentos e água contaminados, portanto o trato gastrointestinal é sua principal via de entrada no hospedeiro. Para promover a infecção o parasita desenvolveu diversas estratégias para ultrapassar rapidamente a barreira epitelial intestinal (JONES *et al.*, 2017).

A capacidade do *Toxoplasma gondii* em se disseminar no hospedeiro depende de sua habilidade de evitar uma sequência de respostas antimicrobianas que são iniciadas rapidamente após a infecção (GREGG *et al.*, 2013). Essa invasão do parasita a célula do hospedeiro ocorre em torno de 30 segundos (SIBLEY e ANDREWS, 2000). Segundo Howe e Sibley (1995), a cepa RH, a mesma utilizada no presente estudo, é a mais virulenta, com isso consegue se replicar rapidamente promovendo a infecção.

Sabe-se que a toxoplasmose se estabelece inicialmente no organismo através da infecção no intestino delgado sendo amplamente reforçada a via luminal, porém a região exata não é bem descrita. Até o momento está estabelecido que o íleo do intestino delgado é o principal sítio de replicação do *Toxoplasma gondii* como apontado por Dubey *et al.* (1997), Speer *et al.* (1998) e Barragan *et al.* (2005), porém Courret *et al.* (2006) realizaram um estudo utilizando análise quantitativa demonstrando altas cargas parasitárias presentes no jejuno e Góis *et al.* (2015) destacaram lesões no jejuno de ratos após infecção por *T. gondii*. Este dado também foi reforçado pelo trabalho de Coombes *et al.* (2013) através de ensaios de microscopia que relataram vários pontos de marcação no intestino delgado antes da disseminação da infecção. Com base nisso, a célula IEC-6 caracterizada por Quaroni *et al.* (1979) é um dos modelos viáveis para experimentos *in vitro* por se tratar de uma linhagem celular derivada da cripta do jejuno de rato (*Rattus norvegicus*), para estudos de interação celular com *Toxoplasma gondii* a fim de avaliar alterações neste microambiente celular.

Estudos como de Azevedo (2011) e Muno *et al.* (2015), mostraram que a quantidade de parasitas internalizados é condizente com a proporção de infecção

utilizada. Com isso, no presente estudo, foram realizadas as infecções com a cepa RH nas proporções de 1 parasita por célula, 5 parasitas por célula e 10 parasitas por célula a fim de avaliar os danos celulares provocados pela parasitemia em 24, 48 e 72 horas. Na literatura temos relatos de estudos que utilizam estas proporções nos seus respectivos experimentos, como visto em Jabari *et al.* (2018) com a proporção de 1:1, Briceño *et al.* (2016) utilizando a proporção 5:1 e em De Carvalho *et al.* (2021) com a proporção 10:1.

Verificou-se que a infecção realizada em 10:1 apresentou maiores alterações na morfologia e no microambiente quando comparada à infecção 5:1 e 1:1. Esses dados podem ser evidenciados já a partir de 24 horas de infecção conforme mostrado na Figura 19, sendo possível visualizar um maior número de células mortas quando as células são infectadas na proporção de 10:1 (figura 19D). Ao observar a figura 20, com aumento de 400x, também em 24 horas de infecção, é perceptível o aparecimento de alterações morfológicas quando as células infectadas (figura 20C e 20D) são comparadas com o controle (figura 20A), porém essas alterações são consideravelmente maiores na proporção de infecção de 10:1 (figura 20D), com células mais túrgidas devido à parasitemia. Por outro lado, na proporção de infecção de 1:1 as alterações na morfologia estão presentes, porém com menos agressividade.

As alterações na morfologia celular e no microambiente tornam-se mais proeminentes com o aumento do tempo de infecção. Em 48 horas (figura 21 e 22), é possível visualizar um grande aumento de parasitas tanto no meio intracelular, mostrando que houve replicação do parasita pelo processo de endodiogenia, como também o aumento do *Toxoplasma gondii* no meio extracelular, devido ao rompimento de algumas células infectadas, levando ao processo de reinfecção das células sobreviventes (DUBEY *et al.*, 1998). Devido a isso, as células infectadas adquirem padrões morfológicos descontínuos, sendo tais alterações ainda mais evidentes na proporção de infecção de 10 parasitas por célula.

Ao iniciar os tempos de infecção de 72 horas (figura 23 e 24), é possível observar nas três proporções a diminuição de células viáveis. No entanto, nas proporções de infecção em 1:1 e 5:1 parasitas por célula é possível destacar que há mais células viáveis no microambiente, apesar das alterações morfológicas, permitindo monitorar as alterações no microambiente como visto por Briceño *et al.* (2016).

A proporção de infecção 10:1 foi usada em outras linhagens como visto no trabalho de De Carvalho *et al.* (2021), e essa mesma proporção também foi utilizada na linhagem IEC-6 por Muno *et al.* (2014) com a cepa ME-49 por 10 dias, porém observamos que essa proporção de infecção na cepa RH apresentou uma quantidade significativa de células mortas e conseqüentemente a redução de células viáveis, corroborando os dados de Bernstein *et al.* (2020). Todavia, este modelo poderia ser relevante para avaliação da infecção aguda *in vitro* em um curto período de tempo. Outro fato notório, associado ao excesso de células lisadas, é o aumento da quantidade de parasitas no espaço extracelular, mais evidente na proporção 10:1 quando comparado aos tempos anteriores devido ao seu ciclo reprodutivo de cerca de 6 a 12 horas (MENG *et al.* 2009). Portanto, foi possível observar que a proporção de infecção de 10 parasitas por células não seria a mais adequada para estudos em um período superior ao tempo de 48h.

Ao analisar os estudos que envolvem a interação da linhagem celular IEC-6 com o *Toxoplasma gondii*, como os desenvolvidos por Jones (2017) e Muno *et al.* (2014), não há relatos de estudos em relação ao acompanhamento de alterações morfológicas e do microambiente causadas pela parasitemia em experimentos envolvendo da técnica de microscopia por contraste de fase na descrição do processo de infecção pela temporalidade.

Desta forma, o presente trabalho propõe, pela primeira vez na literatura, a utilização desta técnica como componente básico de estudos referentes à parasitemia causada pelo *Toxoplasma gondii* em células do tecido intestinal, uma das principais vias de contaminação e agressão patológica em seres humanos.

6.1.2. Alterações Celulares na Estimulação Pró-Imunoflamatória

O Fator de Necrose Tumoral do Tipo Alfa (TNF- α) é uma citocina polipeptídica com peso molecular de 26 kDa, e quando estimulada é clivada em sua forma que também é bioativa de 17 kDa, predominante durante o processo infeccioso e, portanto, essa citocina pode ser utilizada para mimetizar de maneira eficiente um processo inflamatório no tecido epitelial intestinal (Perez *et al.*, 1990; Kriegler *et al.*, 1988, Tracey e Cerami, 1994).

Além disso, em baixa concentração, tem se mostrado promissora no processo de ativação e proliferação celular diante a um processo infeccioso em células intestinais, como visto por Kaiser e Polk (1997) e EROL *et al.* (2018), em células do

sistema imunológico, mais especificamente macrófagos, como descrito por DE CARVALHO *et al.* (2021).

As células epiteliais intestinais podem, constitutivamente ou por estímulo, produzir uma série de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que desempenham um papel importante na resposta imune da mucosa (STADNYK, 2002, EROL *et al.*, 2018). Além disso, como visto por Chavez *et al.* (1999) na linhagem Caco-2, as células intestinais possuem receptores que respondem a estímulos gerados por infecções intestinais e citocinas específicas como, por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o Interferon Gama (IFN- γ) produzido por células do sistema imune ativadas (KAISER e POLK, 1997).

Tendo em vista este comportamento complexo e protetivo do epitélio intestinal, e o seu comportamento no processo de infecção com o *T. gondii* já observado em nosso trabalho, foram realizados experimentos de análise quantitativa e qualitativa por microscopia óptica de contraste de fase das culturas de células da linhagem epitelial intestinal IEC-6 tratadas com o fator pró-imunoinflamatório TNF- α .

Na figura 25 é possível observar que o quantitativo de células das culturas que receberam o fator pró-imunoinflamatório TNF- α , na concentração de 1 ng/mL, aumentou sensivelmente após 24 e 48 horas de incubação, sem a alteração da morfologia celular (Figura 26). Este comportamento pode indicar uma possível ativação destas células, a partir da ação do TNF- α promovendo sua reorganização no microambiente celular.

Por outro lado, em outros estudos envolvendo a interação e o tratamento de linhagens celulares distintas com TNF- α , foi possível observar uma diminuição na viabilidade celular já nos primeiros horários de interação (TANG e FANG, 2017). Neste trabalho foi identificada uma acentuada redução na proliferação celular na linhagem humana de células musculares lisas vasculares (CMLVs) após 1h de interação com o TNF- α . Este comportamento poderia ser justificado pela diferença de concentração utilizada no tratamento das células, visto que utilizaram uma concentração 100 vezes maior (100 ng/mL) do que a utilizada em nossos estudos.

Outros estudos, utilizando as mesmas concentrações elevadas de TNF- α (100 ng/mL) em culturas de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC-CMs) gerados a partir de pacientes com arritmia, também apresentaram resultados semelhantes relacionados à morte celular, no qual quanto maior a dose, menor a viabilidade celular. Porém, estes mesmos estudos

demonstraram que a redução da viabilidade celular se apresentava dose dependente, ou seja, em quanto maior a concentração de TNF- α maior a o percentual de morte celular (SARAF *et al.*, 2021).

Por outro lado, estudos de nosso grupo, utilizando células do sistema imunológico representadas pela linhagem celular macrófaga J774-G8, demonstraram que a viabilidade e a manutenção da morfologia celular eram mantidas após o tratamento com TNF- α , na concentração de 1ng/mL. E em contrariedade com os estudos demonstrados anteriormente, havia um aumento considerável do crescimento celular, o que se refletiu no aumento da expressão da proteína Cx43 (DE CARVALHO, 2017), responsável pela formação de junções comunicantes funcionais em macrófagos (FORTES *et al.*, 2004).

Assim, diante do exposto, é possível inferir que o fator pró-imunoinflamatório TNF- α em concentrações ideais e em um intervalo de tempo controlado pode ativar o epitélio intestinal, a exemplo da linhagem celular IEC-6, o que poderá ser utilizado em ensaios futuros de proteção celular em relação à patógenos que agridam este tecido no processo de infecção.

6.2 Expressão Proteica da Cx43 na Infecção por *T. gondii*

Ao longo dos anos, inúmeros estudos vêm sendo realizados para que se tenha um melhor entendimento das alterações causadas pelo protozoário *Toxoplasma gondii* no organismo humano. Os taquizoítas de *T. gondii* infectam e transmigram entre células epiteliais intestinais adjacentes e promovem a produção de mediadores inflamatórios específicos. Durante a invasão, o parasita *T. gondii* foi co-localizado com a proteína Ocludina. Este achado inferiu que a ocludina poderia estar desempenhando alguma função na invasão de *T. gondii* em células epiteliais do intestino delgado (Weight, *et al.*, 2015).

Dentre as diversas proteínas importantes neste cenário, merecem destaque as conexinas, que formam as junções comunicantes, envolvidas com a comunicação juncional entre as células permitindo a passagem de moléculas com peso molecular de até 1kDa, responsáveis por regular inúmeras funções teciduais. Em infecções parasitárias, tais proteínas sofrem alterações funcionais consideráveis, assumindo um papel importante na alteração do comportamento tecidual infectado. (DE CARVALHO *et al.*, 1998) Estudos da interação de cardiomiócitos com o protozoário *Trypanosoma*

cruzi demonstraram a diminuição das proteínas Cx43 e ZO-1 na membrana plasmática (Goldenberg *et al.*, 2000).

Deste modo, o presente estudo avaliou não somente as alterações relacionadas com a viabilidade celular e os aspectos morfológicos da linhagem celular intestinal IEC-6, infectada com o *Toxoplasma gondii* ou tratada com o fator pró-inflamatório TNF- α , como também buscou analisar os níveis de expressão proteica da conexina 43 (Cx43). Assim, seria possível uma melhor compreensão do perfil da comunicação juncional não só em um microambiente de infecção aguda gerada pelo protozoário, como também em uma situação de ativação inflamatória.

A partir dos resultados encontrados foi possível observar que houve um aumento na expressão proteica da Cx43 após 24 horas de infecção (figura 28A - Tx24) quando comparados com os níveis expressos pelas células controle (não infectadas) (figura 28A - C). Esse dado está alinhado com os achados de Adesse *et al.* (2007) utilizando cultura de cardiomiócitos de embriões de camundongos Swiss Webster. Seus estudos demonstraram que durante as primeiras horas de infecção com o *Trypanosoma cruzi* as células apresentaram um aumento de aproximadamente 32% na expressão de proteína Cx43.

Desta forma, é possível observar que em 24 horas de infecção com o parasita *T. gondii*, pode ocorrer a ativação de vias de sinalização celular que estimulem o tecido epitelial intestinal, neste caso representando pelas células IEC-6, intensificando o seu perfil de comunicação intercelular e promovendo assim um significativo aumento na expressão proteica de Cx43. Portanto, seria possível aumentar a formação de junções comunicantes que pudessem estar atuando no processo de regulação da infecção aguda gerada pelo parasita. O aumento tanto da expressão como da imunorreatividade das conexinas em ambientes pró-inflamatórios e lesionados já foram observados em diversos estudos. A expressão alterada de conexinas também estar associada às alterações inflamatórias da mucosa nasossinusal que caracterizam a rinosinusite crônica (Kim *et al.*, 2016). Zou *et al.* (2019) avaliaram se a inibição de Cx43 atenuaria a lesão intestinal induzida por sepse e conseguiram demonstrar em seus estudos que a conexina no epitélio intestinal chegou ao pico após 24h, justamente quando a lesão se encontrava mais acentuada. Mostraram através da análise de Western Blot e do ensaio de Luciferase que com a inibição da conexina 43 se tem uma atenuação na progressão da lesão devido ao bloqueio da passagem de espécies reativas de oxigênio pelo canal juncional.

Entretanto, após 48 horas de interação parasito-célula (figura 28A - Tx48), foi possível identificar uma sensível redução da expressão proteica da Cx43, o que pode ser justificado pelo desequilíbrio e desorganização celular a qual as células infectadas estão submetidas. Dados semelhantes foram encontrados no trabalho de Goldenberg *et al.* (1999) onde observaram em culturas embrionárias de miócitos cardíacos de camundongos o aumento no número de parasitas *T. cruzi* por célula com o tempo infecção, enquanto a marcação específica de Cx43 é proporcionalmente reduzida nas células infectadas e apenas as células com parasitas internalizados perdem a marcação específica de Cx43.

Apesar do decréscimo nos níveis de conexina expressos apresentados em 48h de infecção, foi possível observar que em 72h de interação da IEC-6 com o protozoário *Toxoplasma gondii* os níveis de conexina voltaram a se elevar. Por outro lado, esses dados associados à 72h de infecção parasitária são controversos quando comparados com a literatura, que demonstra as células de linhagem epitelial de rim (células MDCK II) ao serem infectadas com *T. cruzi* por 72h, apresentaram uma diminuição drástica na imunorreatividade Cx43 na maioria das células altamente infectadas e uma queda de 61% nos níveis da proteína (ADESSE *et al.*, 2011). Resposta similar foi encontrada nas células macrofágicas J774-G8, onde em 48h de infecção se tem uma queda drásticas das conexinas e com 72h de infecção a proteína era praticamente inexistente na cultura (DE CARVALHO *et al.*, 2021). A diferença entre esses dados pode ser em parte explicada pelas altas concentrações de parasitas utilizadas nos estudos, já que o presente estudo utilizou uma proporção de infecção mais branda.

Ainda estudando as possíveis alterações relacionadas aos níveis de expressão proteica da Cx43 nas células IEC-6, foram realizados experimentos imunoeletroforéticos (Western blot) na linhagem celular quando tratada com TNF- α nos horários de 24, 48 e 72 horas. Mesmo diante de diferenças estatísticas não significativas (figura 28B), foi possível observar que as células IEC-6 apresentaram aumento nos níveis de expressão de Cx43 em 24, 48 e 72 horas de tratamento com TNF- α (figura 28A - T24, T48, T72), quando comparadas com as células controle.

Quando comparados esses dados com os achados de Kimura e Nishida (2010), onde foi analisada a ação do TNF- α sobre fibroblastos da córnea humana, é possível observar uma resposta diferente quando comparadas com células do epitélio intestinal. Os fibroblastos, neste estudo, apresentaram uma significativa diminuição da expressão proteica da Cx43, enquanto o presente trabalho do nosso grupo

identificou o oposto, na qual linhagem celular IEC-6 apresentou o aumento na expressão da Cx43 (figura 28B), quando comparada ao controle.

Em outros estudos, Zhang *et al.* (2013), também demonstraram que linhagens de astrócitos espinhais primários apresentavam uma menor expressão da proteína Cx43, porém com tratamentos que envolviam concentrações de TNF- α maiores em 10 vezes, ou seja, à 10ng/mL, quando comparadas com as concentrações utilizadas em nosso trabalho.

6.3 Localização da Cx43 em Células do Epitélio Intestinal

Recentemente, diversos estudos têm investigado possíveis alterações causadas pelo *Toxoplasma gondii* em proteínas específicas das células hospedeiras. Proteínas essas relacionadas com a modulação de uma série de processos como resposta imunológica, ciclo celular, metabolismo, apoptose e organização do citoesqueleto (ZHOU *et al.*, 2011; ELE *et al.*, 2016).

Pesquisas mostraram relações diretas da infecção com o protozoário e alterações nas junções celulares, Briceño *et al.* (2016) ao infectarem células da linhagem caco-2 com o protozoário *Toxoplasma gondii* identificaram modificações nas proteínas ZO-1 e ocludina, que ficaram concentradas no citoplasma da célula, como consequência ocorreu uma redução na polaridade devido a diminuição da resistência transepitelial. Além disso a infecção promoveu alterações na distribuição do filamento de actina, fazendo com que as microvilosidades das células ficassem menos desenvolvidas.

Nos experimentos realizados foi possível observar a evolução do processo de desorganização do citoesqueleto, como demonstrado nas figuras 30B, 31B e 32B, corroborando com os dados de Briceño *et al.* (2016), apesar de se tratar de linhagens celular distintas, assim como ocorre na célula caco-2, a célula IEC-6 após o processo de evasão do *Toxoplasma gondii* tem a organização do citoesqueleto interrompida o que promove um padrões descontínuos de rede, resultando em mudanças estruturais da monocamada de células epiteliais devido a infecção por *T. gondii* no microambiente do hospedeiro.

É conhecido que a interação entres as células pelas junções comunicantes é regulada tanto pela síntese das conexinas, como também pelo seu transporte, oligomerização, inserção e remoção da membrana celular. Entretanto, o ciclo de vida da conexina é curto, pesquisas mostram que sua meia vida não ultrapassa de 5 horas

(Laird, 2005). É válido ressaltar que, é através dos microtúbulos que os conexons são transportados do complexo de Golgi para a membrana plasmática da célula, após a síntese e oligomerização das conexinas (DHEIN, 1998, GAIETTA *et al.*, 2002; SOSINSKY *et al.*, 2007).

Com base nesses dados pode-se inferir que a redução da Cx43 está diretamente ligada ao comportamento do citoesqueleto celular como visto na figura 29, 30, 31 e 32 deste trabalho, comportamento similar também relatado nos experimentos de De Carvalho *et al.* (2021). No gráfico da análise de imunofluorescência confocal (figura 33) onde é possível observar a porcentagem da área marcada pelos anticorpos anti-conexina 43 e faloidina sobre a área total da imagem, visualiza-se que com o aumento da desorganização do citoesqueleto, mostrado pelo desarranjo dos filamentos de F-actina, se teve modificações no posicionamento da proteína Cx43 no seu local morfofuncional na membrana plasmática (figura 29).

Contudo dois pontos que merecem destaque são o aumento da marcação da conexina 43 no citoplasma no horário de 48h (figura 31C) e o aumento da marcação dos filamentos de F-actina no horário de 72h (figura 32B). O aumento da marcação da faloidina é justificado pelo fato de o grande dano celular causado pelo protozoário fazer com que o protocolo para marcação dos filamentos de F-actina da célula IEC-6 conseguisse marcar também o citoesqueleto do *Toxoplasma gondii* no interior da célula.

Em relação ao aumento da marcação da Cx43 em 48 horas de infecção na célula IEC-6 pode ser inferido ao fato da tentativa de a célula posicionar as conexinas previamente produzidas na membrana plasmática, contudo com o aumento do desarranjo do citoesqueleto uma parcela da conexina se manteve no citoplasma.

Giepmans e Moolenaar (1998) demonstraram em seus estudos que a Cx43 também interage com outras proteínas. Através de ensaios de imunoprecipitação e imunofluorescência, conseguiram mostrar que a região carboxiterminal da conexina 43 pode interagir com o 2º domínio PDZ da proteína ZO1. Diante desses achados inferiram que a ZO1 estaria envolvida com o ancoramento das conexinas na membrana plasmática. Matsushita *et al.* (1999) demonstraram a relação da Cx43 com outras proteínas celulares, como integrina, desmoplaquinas, caderinas e laminina. Toyofuku *et al.* (2001) apresentaram em seu estudo que a conexina 43 tem interação

com a proteína ZO-1 nos cardiomiócitos, porém como ocorre essa interação ainda não foi bem elucidado.

Outras proteínas que merecem ser destacadas nesse processo são as α -catenina e α -actinina que fazem parte da formação do citoesqueleto e de acordo com Giepmans *et al.* (2004) estas proteínas estão relacionadas com a inserção da conexina na membrana plasmática, visto que a proteína α -catenina está presente no complexo de proteínas que estão associadas com a proteína de adesão E-caderina, co-localizada e co-imunoprecipitada com a Cx43. Estudos de Fujimoto *et al.* (1997), mostraram através de ensaios de microscopia confocal que no início da formação da placa juncional as α -cateninas possuem co-localização com a Cx43 na membrana plasmática celular, portanto assume extrema importância no endereçamento e na inserção da conexina na membrana.

Sabe-se que, proteínas específicas estão envolvidas com o posicionamento da conexina 43 na membrana plasmática, o esquema a seguir ilustra (em verde) genes que estariam sendo negativamente regulados na linhagem celular J774-A1, portanto promovendo a redução das proteínas que seriam expressas por estes genes, levando assim a diminuição da conexina na membrana plasmática (adaptado de Giepmans *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que durante um processo infeccioso, como o gerado pelo *Toxoplasma gondii*, as células podem aumentar os níveis comunicação entre si, principalmente para que as informações possam ser passadas a diante, como ocorre na apresentação de antígenos para as células que compõem o sistema imunológico (ABBAS, 2004). Esta comunicação entre as células também pode ser feita por junções comunicantes, como apresentado não só por trabalhos do nosso grupo (De Carvalho *et al.*, 2021), como também por outros autores (EUGENIN *et al.* 2003).

Deste modo, além de observar as alterações no posicionamento da Cx43 na membrana plasmática das células, foi possível observar que a infecção com os parasitas pode alterar a organização celular, bem como a conexina tem a sua expressão alterada em diversos momentos da infecção parasitária, o que pode nos remeter a um papel de destaque no ambiente infecto-inflamatório.

Destacando então que o protozoário *Toxoplasma gondii* possui a capacidade de remodelar o citoesqueleto celular e modificar todo o complexo juncional da célula, não apenas as junções de adesão como também as junções comunicantes mediadas pela Cx43, sendo este um possível mecanismo de evasão do protozoário.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que:

- As células da linhagem epitelial intestinal IEC-6 infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii* apresentaram modificações no microambiente, alterações morfológicas e diminuição no tempo de vida celular.
- As células epiteliais intestinais (IEC-6), quando tratadas com TNF- α em baixa concentração consegue promover o aumento do número de células em 48h de tratamento.
- As células epiteliais intestinais (IEC-6), quando tratadas com TNF- α em baixa concentração não conseguem promover o aumento significativo da expressão de Cx43.
- A IEC-6 infectada com o *Toxoplasma gondii* tem variações nos níveis de proteína Conexina 43 expressos, de acordo com o tempo de infecção.
- Na linhagem celular IEC-6 infectada com o *Toxoplasma gondii* a proteína de citoesqueleto F-actina é desorganizada.
- Ocorreu uma tentativa de direcionar a Cx43 para a membrana celular em 48h de infecção com o *T. gondii*.
- A proteína Cx43 na IEC-6 sofreu uma sensível redução na membrana plasmática após a infecção com o protozoário *Toxoplasma gondii*, tendo a interrupção do posicionamento em seu local morfofuncional em 72 horas de infecção.

8. REFERÊNCIAS

- ABIKO, Y. *et al.* Changes of Tight Junction Protein Claudins in Small Intestine and Kidney Tissues of Mice Fed a DDC Diet; **Journal of Toxicologic Pathology**; V. 26, p. 433–438, 2013.
- ADESSE, D. *et al.* Gap junctions and chagas disease. **Adv Parasitol.** v. 76 p. 63-81, 2011.
- ADESSE, D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces changes in cardiac connexin43 expression. **Microbes Infect.** v. 10, n. 1, p. 8-21, 2008.
- AIRES, M. M. *et al.* **Fisiologia** 3^o edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ALBERTS B, *et al.* **Molecular Biology of the Cell**, 5^o edição, New York: Garland Publishing, 2010.
- ALLAM-NDOUL B.; CASTONGUAY-PARADIS S.; VEILLEUX A. Gut Microbiota and Intestinal Trans-Epithelial Permeability. **Int J Mol Sci.** v. 21, n. 17, p. 6402. 2020.
- ANDRADE, G.M.Q.; TONELLI, E.; Infecções perinatais. **Guanabara Koogan**, p. 471-492, 2006.
- AZEVEDO, JULIANA COSTA DE. ***Toxoplasma gondii* Inibe a Expressão da Óxido Nítrico Sintase Induzida e a Produção de Óxido Nítrico na Linhagem de Célula Epitelial Intestinal IEC-6.** Dissertação (Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2011.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *et al.* Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases journal.** v:9, p:55-62, 2003.
- BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 4, p. 561-568, 2005.
- BENNETT, M.V. *et al.* Gap junctions: new tools, new answers, new questions. **Neuron**, v.6, p.305-320, 1991.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B. M. **Berne & levy physiology.** 6^a Edição, Elsevier Brasil, Rio de Janeiro, 2009.
- BERNSTEIN, M. *et al.* Evaluation of biological behavior of *Toxoplasma gondii* atypical isolates 14 and 163. **Experimental parasitology**, v. 211, p. 107860, 2020.
- BLACK, M.W.; BOOTHROYD J.C.; Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*.; **Microbiol Mol Biol Rev**; V. 64, n.3, 607-23, 2000.

BOYER, K. M.; Congenital Toxoplasmosis: Current Status of Diagnosis, Treatment and Prevention. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases.**; v. 11, n. 3, p. 165–171, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Atenção ao pré-natal de baixo risco.** Cadernos de Atenção Básica, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, nº 32, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Gestação de alto risco: manual técnico.** 5. ed.: Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p. 115-118, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Toxoplasmose congênita. In: Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde.** 2º edição. Ministério da Saúde, 2014.

BRICEÑO, M.P. *et al.* *Toxoplasma gondii* Infection Promotes Epithelial Barrier Dysfunction of Caco-2 Cells.; **J Histochem Cytochem.**; V.64, n. 8, p. 459-69, 2016.

CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M.; **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**, Guanabara Koogan, 2ª edição, p. 278-288, 2001.

CAMPOS DE CARVALHO A.C.; *et al.* Gap Junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as a consequence of protozoan infection. **Brain research**, v. 790, n. 1-2, p. 304-314, 1998.

CARTAGENA-RIVERA, A. X.; *et al.* Apical surface supracellular mechanical properties in polarized epithelium using noninvasive acoustic force spectroscopy. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1030, 2017.

CHAVEZ A.M. *et al.* Acquired interferon gamma responsiveness during Caco-2 cell differentiation: effects on iNOS gene expression. **Gut**. v. 44, n. 5, p. 659-65, 1999.

CHEN, J. *et al.* Protective effects of baicalin on LPS-induced injury in intestinal epithelial cells and intercellular tight junctions. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 93, n. 4, p. 233-237, 2014.

COOMBES, J.L. *et al.* Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.110, n. 21, 2013.

COURRET, N., *et al.* CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v.107, n.309, 2006.

DE CARVALHO A.C., *et al.* Gap junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as consequence of protozoan infection. **Brain Res**. V. 790, n. 1-2, p. 304-14. 1998

DE CARVALHO, G.O.A.M. *et al.* **Comunicação Juncional em Macrófago: Papel e Modulação da Junção Comunicante no Microambiente da Infecção.** Dissertação

(Mestre em Ciências), Instituto de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2017.

DE CARVALHO, G.O.A.M. *et al.* Junction communication in the immune system: modulation of the GAP junctions by infection with *Toxoplasma gondii*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 4165-4182, 2021.

DE CARVALHO, G.O.A.M. *et al.* Morphological evaluation of macrophage infected with *Toxoplasma gondii*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 4035-4050, 2021

DECKERT-SCHLÜTER M. *et al.* Interferon-gamma receptor-mediated but not tumor necrosis factor receptor type 1- or type 2-mediated signaling is crucial for the activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine *Toxoplasma* encephalitis. **Am J Pathol.** v. 154, n. 5, p. 1549-61, 1999.

DERMIETZEL, R.; SPRAY, D.C. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why?. **Trends in neurosciences**, v. 16, n. 5, p. 186-192, 1993.

DHEIN, S. Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 19, n. 6, p. 229-241, 1998.

DIMIER I.H.; BOUT D.T. Rat intestinal epithelial cell line IEC-6 is activated by recombinant interferon-gamma to inhibit replication of the coccidian *Toxoplasma gondii*. **Eur J Immunol.** v. 23, n. 4, p. 981-3, 1993.

DUBEY J.P.; FRENKEL J.K.; Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology.** v.23, n.4, p.537, 1976.

DUBEY, J.P. *et al.* Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of - different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology.** v. 44, p. 592–602, 1997

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, p.1, 2012.

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

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **The Journal of experimental medicine**, v.132 n.4, p.636–662, 1970.

DUNAY, I.R.; *et al.* Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, 2018.

DUNN, D., *et al.* Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **The Lancet**, v. 353, n. 9167, p. 1829-1833, 1999.

ELE J. J *et al.* Proteomic Profiling of Mouse Liver following Acute *Toxoplasma gondii* Infection. **PloS One**. v:11, n:3, 2016.

ELMORE, S.A.; *et al.* *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190-196, 2010.

ENGLISH, E. D., BOYLE, J. P.; Impact of Engineered Expression of Mitochondrial Association Factor 1b on *Toxoplasma gondii* Infection and the Host Response in a Mouse Model. **mSphere**, v. 3, n. 5, 2018.

EROL A.; TIRYAKI S.; ERGÜN O. A simplified cell culture model for research on intestinal inflammation. **Turk J Med Sci**. v. 48, n. 2, p. 435-440, 2018

EUGENIN, E.A. *et al.* Microglia at brain stab wounds express connexin and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon- γ and tumor necrosis factor- α . **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.98, p.4190-4195, 2001.

EUGENÍN E.A. *et al.* TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. **J Immunol**. v. 170, n. 3, p. 1320-8, 2003

EVANS, W. H. Cell communication across gap junctions: a historical perspective and current developments. **Biochemical Society transactions**, v. 43, n. 3, p. 450-459, 2015.

FERGUSON, D. J. P., *et al.* Observations on the ultrastructure of the sporocyst and the initiation of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology**, v. 86, n. 1-6, p. 165-168, 1978.

FERREIRA-DA-SILVA, M.F. *et al.* Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biosystems**, v. 4, n. 8, p. 824-834, 2008.

FLAGG-NEWTON, J., SIMPONSON, I., LOEWENSTEIN, W.R. Permeability of the cell-to-cell membrane channels in mammalian cell junctions. **Science**, v.205, p.404, 1979.

FORSTER, C; Tight Junctions and the modulation of barrier function in disease, Institute of Anatomy and Cell Biology. **Histochemistry and cell biology**. v. 130, n. 1, p. 55-70, 2008.

FRESHNEY, I. R. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 15^oedição, 2005.

FUJIMOTO, J. *et al.* Molecular cloning and characterization of focal adhesion kinase of *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology of the Cell**. v:8, 1997.

GIEPMANS, B.N. Gap junctions and connexin-interacting proteins. **Cardiovasc Res.** v. 62, n. 2, p. 233-245, 2004.

GILBERT, R. E., *et al.* Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 8, p. e277, 2008.

GILULA, N.B., REEVES, O.R.; STEINBACH, A. Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. **Nature.** V.235, p.262, 1972.

GÓIS, MARCELO BIONDARO. ***Toxoplasma gondii* causa alterações na túnica mucosa e no plexo submucoso do jejuno e do cólon proximal de ratos.** Ph.D. Tese em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá, 2015.

GOLDENBERG, R.C.; GONÇALVES, A.; DE CARVALHO, A.C.C. (1999). Gap junctions are specifically disrupted by *Trypanosoma cruzi* infection. In **Current Topics in Membranes.** Academic Press. v. 49, p. 625-634.

GOLDSTEIN, ELLIE JC; MONTOYA, JOSE G.; REMINGTON, JACK S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 4, p. 554-566, 2008.

GOODENOUGH, D.A.; PAUL, D.L. Gap junctions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 1, p. a002576, 2009.

GREGG, B. *et al.* Replication and distribution of *Toxoplasma gondii* in the small intestine after oral infection with tissue cysts. **Infection and immunity**, 2013.

GUYTON. R.; HALL, J. E; **Tratado De Fisiologia Médica**, 12ª Edição, Elsevier, Rio de Janeiro, 2011.

HANDEL, A. *et al.* Transporte de antígeno mediado por junções comunicantes em respostas imunes. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 11, p. 463-466, 2007.

HEHL, A.B.; BASSO, W.U; LIPPUNER, C.; Asexual expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 66, 2015.

HERVE, J.C.; BOURMEYSTER N.; SARROUILHE D. Diversity in protein–protein interactions of connexins: emerging roles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1662, n. 1-2, p. 22-41, 2004.

HIDE, G.; Role of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in prevalence of infection.; **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, V. 14, n. 3, p. 335–344, 2016.

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

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D.; *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**. v:172 p:1561-1566, 1995.

HUNTER, A.W.; JOURDAN, J.; GOURDIE, R.G.; Fusion of GFP to the carboxyl terminus of connexin43 increases gap junction size in HeLa cells. **Cell Communication & Adhesion**. v:10, p:211-214, 2003

JABARI S. *et al.* In vitro culture of *Toxoplasma gondii* in HeLa, Vero, RBK and A549 cell lines. **Infez Med**. v. 26, n. 2, p. 145-147, 2018

JONES, E.J.; KORCSMAROS, T.; CARDING, S.R.; Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. **Tissue Barriers**. V. 5, n. 1, 2017.

JONES, J. L. *et al.* Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 56, n. 5, p. 296-305, 2001.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital Toxoplasmosis. **American Family Physician**, v. 67, n. 10, p. 2131-2138, 2003.

KAISER G.C.; POLK D.B. Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. **Gastroenterology**. V. 112, n. 4, p. 1231-40, 1997.

KIM, R. *et al.* Connexin gap junction channels and chronic rhinosinusitis. **Int Forum Allergy Rhinol**. v. 6, n. 6, p. 611-617, 2016.

KIM, Y. *et al.* Role of Hemichannels in CNS Inflammation and the Inflammasome Pathway. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. v:104, p:1-37, 2016.

KIM, Y. *et al.* Characterizing the mode of action of extracellular Connexin43 channel blocking mimetic peptides in an in vitro ischemia injury model. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**. v:1861, n:2, p:68-78, 2017.

KIMURA K.; NISHIDA T. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in downregulation of the gap-junction protein Connexin43 by TNF- α in human corneal fibroblasts. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v. 51, n. 4, p. 1943-7, 2010.

KOVAL, M.; MOLINA, S. A.; BURT, J. M.; Mix and match: Investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues. **FEBS Lett**. v.588, n.8, p.1193–1204, 2014.

KRIEGLER, M. *et al.* Uma nova forma de TNF/cachectina é uma proteína transmembranar citotóxica da superfície celular: Ramificações para a fisiologia complexa do TNF. **Célula**, v. 53, n. 1, p. 45-53, 1988.

KUMAR, N.M.; GILULA, N.B. The gap junction communication channel. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 381-388, 1996.

LAIRD, D.W. Life cycle of connexins in health and disease. **Biochemical Journal**, v.

394, n. 3, p. 527-543, 2006.

LAIRD, D.W.; Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v:1711, n:2, p:172-182, 2005.

LAIRD, D.W.; LAMPE, P.D.; Therapeutic strategies targeting connexins. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 12, p. 905, 2018.

LEAPHART, C.L. *et al.* Interferon Gama Inhibits Intestinal Restitution By Preventing Gap Junction Communication Between Enterocytes; **Gastroenterology**; v. 132, n. 7, p. 2395-2411, 2007.

LI, C.; POZNANSKY, M. J.; Characterization of the ZO-1 Protein in Endothelial and Other Cell Lines, **Journal of cell science**, v. 97, n. 2, p. 231-237, 1990.

LIESENFELD, O. *et al.* Confirmatory Serologic Testing for Acute Toxoplasmosis and Rate of Induced Abortions Among Women Reported to Have Positive Toxoplasma Immunoglobulin M Antibody Titers. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 184, p. 140-145, 2001.

LOEWENSTEIN, W.R.; Permeability of membrane junctions. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.137, p.441, 1966.

LOZUPONE C.A. *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**. v. 489, n. 7415, p. 220-30, 2012.

MAKOWSKI, L. *et al.* junction structures: Analysis of the x-ray diffraction data. **The Journal of cell biology**, v. 74, n. 2, p. 629-645, 1977.

MANKERTZ J. *et al.* TNF alpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. **Cell Tissue Res**. v. 336, n. 1, p. 67-77, 2009.

MARQUES, B.A. *et al.* Revisão sistemática dos métodos sorológicos utilizados em gestantes nos programas de triagem diagnóstica pré-natal da toxoplasmose. **Revista Médica de Minas Gerais**. V. 25, n. 6, p. 68-81, 2015.

MCLEOD, R. *et al.* Outcome of Treatment for Congenital Toxoplasmosis, 1981–2004: **The National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study**. *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, p. 1383–1394, 2006.

MERCIER, C. *et al.* Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?. **International Journal for Parasitology**. v:35, n: 14, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 08 de mar. 2018.

MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F.M.R.; NAVARRO, I.T.; Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e conduta. **EDUEL**. v:62, 2010.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O.; Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965–1976, 2004.

MUNO, R. M. *et al.* Spontaneous cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in feline epithelial cells in vitro. **Folia Parasitologica**, v.62, n.2, p.113-119, 2014.

MUNO, RENATA MORLEY DE. ***Toxoplasma gondii* - células epiteliais de felinos: novos aspectos do ciclo enteroepitelial in vitro**. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular), Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

NIELSEN, M.S. *et al.* Gap junctions and the connexin protein family; **Cardiovascular Research**, 2004.

NOGUEIRA, A.R. *et al.* Effect of *Toxoplasma gondii* infection on the junctional complex of retinal pigment epithelial cells. **Parasitology**. v:143, n:5, 2016.

NOMA A.; TSUBOI N.; Dependence of junctional conductance on proton, calcium and magnesium ions in cardiac paired cells of guineapig. **The Journal of physiology**, v. 382, n. 1, p. 193-211, 1987.

PADRÃO, J.C., *et al.* *Toxoplasma gondii* infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. **Parasitology international**. vol. 63, n. 5, p. 659-663, 2014.

PERACCHIA, C.; Chemical gating of gap junction channels Roles of calcium, pH and calmodulin, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1662, n. 1-2, p. 61-80, 2004.

PETERSEN, E.; Toxoplasmosis. Semin. **Fetal Neonatal Med**, v. 12, p. 214–23, 2007.

PHAN, L. *et al.* Longitudinal study of new eye lesions in children with toxoplasmosis who were not treated during the first year of life. **American Journal of Ophthalmology**, v. 146, n. 3, p. 375–384, 2006.

PINARD, J. A.; LESLIE, N. S.; IRVINE, P. J.; Maternal Serologic Screening for Toxoplasmosis. **Journal of Midwifery & Woman's Health**, v. 48, n. 5, p. 308-316, 2003.

PODOLSKY, D.K.; *et al.* Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency. **Gastroenterology**, v. 137, n. 1, p. 209-220, 2009.

POLONTCHOUCK, L. *et al.* Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. **Journal of the American College of Cardiology**. v.38, p.883-891, 2001.

PONCE, A. *et al.* Ouabain Modulates the Distribution of Connexin 43 in Epithelial Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 1329-1338, 2016.

PORTER, S. B.; SANDER, M. A.; Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, n.23, p.643-1648, 1992.

QUARONI, A. *et al.* Epithelioid Cell Cultures From Rat Small Intestine Characterization by Morphologic and Immunologic Criteria. **The Journal of cell biology**, v. 80, n. 2, p. 248-265, 1979.

REMINGTON J. S. *et al.* Infectious diseases of the fetus and newborn infant. In:Toxoplasmosis. 6^o edição. **Elsevier Saunders**, p.947-1091, 2006.

REVEL, J.P.; KARNOVSKY, M.J. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of mouse heart and liver, **The Journal of cell biology**, v. 33, n. 3, p. C7, 1967.

REY, L.; *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4^o edição. Guanabara Koogan, p.162-206, 2008.

RICHTER, J.M.; *et al.* Lipopolysaccharide Binding Protein Enables Intestinal Epithelial Restitution Despite Lipopolysaccharide Exposure; **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. V.54, n.5, p.639–644, 2012.

SAÉZ, J.C.; SPRAY, D.C.; Cell Functions. **Encyclopedia of Human Biology**, v.2, 1991.

SANTANA, R. M.; ANDRADE, F. M.; MORON, A. F. Infecções TORCH e gravidez. In: Prado FC, Ramos J, Ribeiro do Valle J, editores. Atualização Terapêutica. 21.ed. São Paulo: Artes Médicas, p.1111-1112. 2003.

SARAF A. *et al.* Functional and molecular effects of TNF- α on human iPSC-derived cardiomyocytes. **Stem Cell Res**. V. 52, p. 102218, 2021.

SEABRA, S.H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R.A. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. **Experimental parasitology**, v. 100, n. 1, p. 62-70, 2002.

SEGRETAIN, D.; FALK, M.M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1662, n. 1-2, p. 3-21, 2004.

SEVERS, N.J. *et al.* Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1662, n. 1-2, p. 138-148, 2004.

SIBLEY, L.D.; ANDREWS, N.W.; Cell Invasion by un-palatable parasites. **Traffic** v:1 p:100-106, 2000.

SIBLEY, L.D.; Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Department of Molecular Microbiology**. v. 240, p 72–91, 2011.

SILVERTHORN, D.U.; **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**, 7ª Edição, Artmed editora, Porto Alegre, 2017.

SKERRETT, I.M.; WILLIAMS, J.B.; A Structural and Functional Comparison of Gap Junction Channels Composed of Connexins and Innexins. **Developmental Neurobiology**. v:77, n:5, p.522-547, 2017.

SOHL, G; WILLECKE, K.; An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. **Cell communication & adhesion**, v. 10, n. 4-6, p. 173-180, 2003.

SOSINSKY, G. E. *et al.* The C-Terminus of Connexin 43 Adopts Different Conformations in the Golgi and Gap Junction as Detected with Structure-Specific Antibodies. **The Biochemical Journal**, v:408, n:3, p.375–385, 2007.

SOUZA, W. *et al.* Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 35-42, 1998.

STADNYK A.W. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. **Can J Gastroenterol**. V. 16, n. 4, p. 241-6, 2002.

TANG M.; FANG J. TNF- α regulates apoptosis of human vascular smooth muscle cells through gap junctions. **Mol Med Rep**. v. 15, n. 3, p. 1407-1411, 2017.

TENTER. A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L.M.; *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**; v:30, p:12-13, 2000.

TEUTSCH, S. M. *et al.* Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. **New England Journal of Medicine**, v.300 p.695-699, 1979.

TOYOFUKU T. *et al.* c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. **The Journal of Biological Chemistry**. v:276, p. 1780-1788, 2001.

TRACEY, M.D.; CERAMI, K.J.; A.. FATOR DE NECROSE TUMORAL: Uma Citocina Pleiotrópica e Alvo Terapêutico. **Revisão Anual de Medicina**, v. 45, n. 1, p. 491–503, 1994.

TREVIZAN, A.R. *et al.* Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats; **Experimental parasitology**, v. 165, p. 22-29, 2016.

UNGER V.M. *et al.* Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. **Science**, v. 283, n. 5405, p. 1176-1180, 1999.

UNWIN, P.N.; ZAMPIGHI, G.; Structure of the junction between communicating cells. **Nature**, v. 283, n. 5747, p. 545, 1980.

VASCONCELOS-SANTOS, D. V. *et al.* Congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology**, v. 116, n. 11, p. 2199-2205. e1, 2009.

WEIDMANN, S.; The electrical constants of Purkinje Fibers. **The Journal of Physiology**. v.118, n.348, 1972.

WEIGHT, C.M. *et al.* Elucidating pathways of *Toxoplasma gondii* invasion in the gastrointestinal tract: involvement of the tight junction protein occludin. **Microbes and infection**, v. 17, n. 10, p. 698-709, 2015.

WHITE, T.W.; PAUL, D.L.; Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. **Annual review of physiology**, v. 61, n. 1, p. 283-310, 1999.

WILSON, M.; McAULEY, J. M.; Toxoplasma. In: MURRAY, P.R. Manual of Clinical Microbiology. 7^o edição. American Society for Microbiology, p. 1374-1382, 1999.

YEAGER, M.; UNGER, V.M.; FALK, M.M.; Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. **Current opinion in structural biology**, v. 8, n. 4, p. 517-524, 1998.

ZHANG F.F. *et al.* Spinal astrocytes stimulated by tumor necrosis factor- α and/or interferon- γ attenuate connexin 43-gap junction via c-jun terminal kinase activity. **J Neurosci Res**. v. 91, n. 6, p. 745-56, 2013.

ZHOU, D.H. *et al.* Modulação do proteoma de macrófagos de camundongos induzido por taquizoítos de *Toxoplasma gondii* in vivo. **Parasitology Research**. v:109, n:6, 2011.

ZNALESNIAK, E. B. ; HOFFMANN, W., modulation of cell-cell contacts uring intestinal restitution *in vitro* and effects of epidermal growth factor (EGF) institute of molecular biology and medicinal chemistry, **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 25, n. 4-5, p. 533-542, 2010.

ZOTTI, C.; *et al.* Use of IgG avidity test in case defnitions of toxoplasmosis in pregnancy. **The new microbiologica**, v. 27, n. 1, p. 17-20, 2004.

ZOU, Z. *et al.* Cx43 inhibition attenuates sepsis-induced intestinal injury via downregulating ROS transfer and the activation of the JNK1/Sirt1/FoxO3a signaling pathway. **Mediators Inflamm**, 2019.