

ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO EPITÉLIO INTESTINAL INDUZIDAS PELO *Toxoplasma gondii*: O PAPEL DA CONEXINA 43

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF THE INTESTINAL EPITHELIUM INDUCED BY *Toxoplasma gondii*: THE ROLE OF CONNEXIN 43

Olga Maria de Jesus Souza^{1,2}; Gabriella Oliveira Alves Moreira de Carvalho^{1,2,3,4}; Ana Carolina Farias das Chagas^{1,2}; João Lucas Eulalio da Silva de Oliveira¹; Regina Coeli dos Santos Goldenberg⁵; Fabio da Silva de Azevedo Fortes^{6,7}.

1. Aluno do Laboratório de Terapia e Fisiologia Celular e Molecular Prof. Antônio Carlos Campos de Carvalho - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 2. Aluno Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BioTrans) - UERJ, UNIGRANRIO, InMetro - Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 3. Preceptora do Laboratório de Genética - Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO Afya), Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 4. Professora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Departamento de Farmácia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 5. Professora do Grupo do Fígado - Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 6. Professor do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BioTrans) - UERJ, UNIGRANRIO, InMetro - Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 7. Professor do Laboratório de Terapia e Fisiologia Celular e Molecular Prof. Antônio Carlos Campos de Carvalho - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

E-mail correspondente: fabio.fortes.uerj@gmail.com

Eixo: 01 - Saúde

RESUMO

Introdução: A toxoplasmose é uma doença causada por um protozoário intracelular obrigatório, o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). O trato gastrointestinal representa uma das principais vias de infecção por *T. gondii* na maioria dos casos. Por esse motivo, o epitélio intestinal é um modelo celular que permite o estudo da primeira linha de defesa contra infecções orais. As junções comunicantes, mediadas pela conexina 43 (Cx43), têm o papel de mediar as interações entre células adjacentes. Na célula epitelial intestinal, a junção comunicante formada pela Cx43 pode ser importante na modulação da resposta da célula a processos infecciosos e na permissão da passagem de agentes importantes para o corpo no processo de infecção. Embora a invasão de parasitas em células hospedeiras seja um evento conhecido, os efeitos dessa infecção ainda não estão bem estabelecidos. **Objetivo:** Diante disso, foi investigado possíveis alterações no posicionamento e na expressão da conexina 43 na célula epitelial intestinal durante o processo de infecção pelo protozoário *T. gondii*. **Método:** Para isso, os ensaios de imunofluorescência e Western Blot foram realizados antes e após a infecção, e uma análise estatística desses dados foi realizada. **Resultados:** As células IEC-6 infectadas com o parasita *Toxoplasma gondii* apresentaram desorganização dos filamentos de F-actina, seguida de redução no posicionamento e na expressão da conexina 43. **Conclusão:** Os resultados obtidos neste estudo indicam que a infecção por *Toxoplasma gondii* compromete a integridade estrutural e funcional das células epiteliais intestinais, promovendo a desorganização do citoesqueleto e a redução da expressão da conexina 43. Esses achados sugerem que o parasita pode interferir diretamente na comunicação intercelular, alteando a barreira epitelial intestinal e, possivelmente, facilitando a disseminação da infecção, assim a conexina 43 representar um alvo relevante para estudos futuros voltados à compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese dessa doença.

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

ABSTRACT

Introduction: Toxoplasmosis is a disease caused by the obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). The gastrointestinal tract represents one of the main routes of *T. gondii* infection in most cases. Therefore, the intestinal epithelium is a relevant cellular model for studying the first line of defense against oral infections. Gap junctions, mediated by connexin 43 (Cx43), play an important role in intercellular communication between adjacent cells. In intestinal epithelial cells, Cx43-mediated gap junctions may contribute to the modulation of cellular responses to infectious processes and regulate the passage of signaling molecules and other relevant factors during infection. Although parasite invasion of host cells is a well-established event, the effects of *T. gondii* infection on intestinal epithelial cells remain poorly understood. **Objective:** Therefore, this study investigated possible alterations in the localization and expression of connexin 43 in intestinal epithelial cells during infection with the protozoan *T. gondii*. **Methods:** Immunofluorescence and Western blot assays were performed before and after infection, followed by statistical analysis of the obtained data. **Results:** IEC-6 cells infected with *Toxoplasma gondii* exhibited disorganization of F-actin filaments, accompanied by reduced localization and expression of connexin 43. **Conclusion:** The results obtained in this study indicate that *Toxoplasma gondii* infection compromises the structural and functional integrity of intestinal epithelial cells, promoting cytoskeletal disorganization and reduced connexin 43 expression. These findings suggest that the parasite may interfere with intercellular communication, potentially altering intestinal epithelial barrier integrity and facilitating the spread of infection. Therefore, connexin 43 may represent a relevant target for future studies aimed at elucidating the mechanisms underlying the pathogenesis of toxoplasmosis.

Keywords: IEC-6. Gap Junctions. *Toxoplasma gondii*. Connexin 43. Intestinal Epithelium.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, apresentando elevada prevalência mundial. Embora a infecção seja geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectada. A transmissão ocorre principalmente pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos ou cistos teciduais. No intestino, o parasita pode invadir enterócitos e proliferar, promovendo inflamação e comprometimento da barreira epitelial.¹⁻³

A integridade da barreira intestinal depende da organização das junções celulares, que participam da proteção contra patógenos e moléculas nocivas. Entre elas, as junções comunicantes, formadas por conexinas como a conexina 43 (Cx43), desempenham importante papel na comunicação intercelular e podem contribuir para a manutenção da organização epitelial e modulação das respostas celulares durante processos infecciosos.^{4,5} Alterações nessas estruturas podem comprometer a integridade da barreira e favorecer a translocação de microrganismos.⁶

Embora os efeitos da infecção por *T. gondii* sobre o epitélio intestinal sejam parcialmente conhecidos, as alterações específicas relacionadas à Cx43 ainda não estão completamente esclarecidas. Estudos demonstram que a infecção pode promover alterações morfológicas e comprometer proteínas associadas às junções celulares.⁷⁻⁹ Dessa forma, este estudo investigou possíveis alterações na localização e expressão da Cx43 em células epiteliais intestinais IEC-6 durante a infecção por *T. gondii*.

METODOLOGIA

Células epiteliais intestinais IEC-6 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1 UI/mL de insulina, 1000 UI/mL de penicilina e 100 UI/mL de estreptomicina, a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Os Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, obtidos por infecção intraperitoneal em camundongos BALB/c conforme aprovação do Comitê de Ética (ID 124396), foram coletados após 48–72 h, quantificados e utilizados para infecção das células IEC-6 na proporção de 10:1 (parasito:célula), durante 1 h a 37 °C. Após esse período, o meio foi substituído e as culturas foram mantidas por 24, 48 e 72 h.

Para avaliação da localização da Cx43 e da organização do citoesqueleto, as células foram submetidas à imunofluorescência utilizando anticorpo anti-Cx43, faloidina para marcação de F-actina e DAPI para os núcleos. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência confocal.

A expressão proteica da Cx43 foi avaliada por Western blot. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 9.3.1, utilizando One-Way ANOVA, considerando significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Nas células controle, observou-se organização regular dos filamentos de F-actina, com marcação de Cx43 predominantemente na membrana celular, formando placas juncionais, e parcialmente no citoplasma.

Após 24h de infecção, observou-se início da desorganização dos filamentos de F-actina, acompanhado de redução da marcação de Cx43 na membrana. Em 48h, houve maior desorganização do citoesqueleto, enquanto a Cx43 permaneceu presente na membrana e no citoplasma. Após 72h, foi observada desorganização acentuada dos filamentos de F-actina e redução evidente da Cx43 na membrana e no citoplasma, concomitantemente à presença de núcleos parasitários intracelulares.

A análise da expressão proteica revelou aumento da Cx43 após 24h de infecção, seguido de redução em 48h e 72h. Apesar da redução observada nos períodos posteriores, os níveis de Cx43 em 72h permaneceram superiores aos do grupo controle.

DISCUSSÃO

Marcação de Conexina 43 e F-actina na infecção por *Toxoplasma gondii*

Diversos estudos têm investigado as alterações causadas por *T. gondii* em proteínas da célula hospedeira, incluindo aquelas envolvidas na resposta imune, metabolismo, apoptose e organização do citoesqueleto^{7,10}. Estudos mostraram que a infecção por *T. gondii* em células Caco-2 alterou as proteínas ZO-1, Claudina-1 e Ocludina, com redistribuição para o citoplasma e desorganização das microvilosidades celulares⁸. No presente estudo, resultados semelhantes foram observados na linhagem IEC-6, com progressiva desorganização dos filamentos de F-actina, indicando que o protozoário interfere na organização estrutural da monocamada epitelial.

O transporte de conexinas do complexo de Golgi até a membrana plasmática depende dos microtúbulos¹¹⁻¹³. A α -catenina e a α -actinina fazem parte da formação do citoesqueleto¹⁴ e podem estar relacionadas com a inserção da Cx43 na membrana¹⁵. No presente estudo, a redução da Cx43 na membrana pode estar associada ao desarranjo do citoesqueleto induzido pela infecção, conforme também observado por De Carvalho e colaboradores¹⁶.

O aumento do desarranjo dos filamentos de F-actina correlacionou-se com alterações no posicionamento da Cx43. Já o acúmulo de Cx43 no citoplasma em 48h sugere uma tentativa da célula em posicionar conexinas previamente produzidas na membrana, processo interrompido pela instabilidade do citoesqueleto. A meia-vida curta da Cx43 reforça a importância de seu transporte eficiente¹⁷.

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

A Cx43 participa da formação de junções comunicantes, essenciais para a passagem de pequenas moléculas entre células¹⁸. Estudos com cardiomiócitos infectados por *Trypanosoma cruzi* demonstraram padrão semelhante ao aqui observado, com aumento inicial e queda subsequente da Cx43¹⁹.

No presente estudo, após 24h de infecção, a expressão proteica da Cx43 aumentou significativamente, sugerindo resposta adaptativa do epitélio intestinal (IEC-6) frente à infecção aguda. Estudos mostraram que, durante sepse, a Cx43 intestinal atinge pico em 24h, momento de maior lesão tecidual. A inibição da Cx43 atenuou o processo inflamatório ao bloquear passagem de espécies reativas de oxigênio via junções comunicantes²⁰. Essa dinâmica pode justificar o aumento inicial observado neste estudo. Contudo, após 48h, a Cx43 diminuiu significativamente, possivelmente devido ao aumento da carga parasitária e consequente

desorganização celular. A elevação nos níveis de Cx43 em 72h, contrasta com estudos utilizando células MDCK II e macrófagos J774-G8, onde a infecção levou à redução drástica da proteína^{21,22}. Tal diferença pode estar associada à menor proporção parasita/célula usada neste protocolo, permitindo uma resposta mais controlada. Além disso, a interação da Cx43 com a ZO-1, já observada em cardiomiócitos²³, pode influenciar o tamanho e estabilidade das placas juncionais²⁴.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que na linhagem celular IEC-6 infectada com *Toxoplasma gondii*, a proteína F-actina do citoesqueleto encontra-se desorganizada. Houve uma tentativa de direcionar a Cx43 para a membrana celular em 48 horas de infecção com *T. gondii* e a proteína Cx43 em IEC-6 sofreu uma redução significativa na membrana plasmática após a infecção com o protozoário *Toxoplasma gondii*, e a interrupção do posicionamento em seu sítio morfofuncional em 72 horas de infecção. A Cx43, portanto, constitui um alvo relevante para a investigação dos mecanismos celulares envolvidos na infecção intestinal por *T. gondii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DUBEY, J.P. & JONES, J.L. (2008) *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, 38: 1.257-1.278.
2. DUBEY, J.P. (2010) Toxoplasmosis of Animals and Humans. **Parasites & Vectors**. v.3, p.112.
3. 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.
4. CHEN, J., *et al.* (2014) 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.
5. KOJIMA, T., *et al.* (2007). Connexins induce and maintain tight junctions in epithelial cells. **Journal of Membrane Biology**. v. 217, n. 1, p. 13-19.
6. MIELE L., (2009) Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**. v. 49, n. 6, p. 1877-87.
7. ZHOU, D.H.; *et al.* (2011) Modulation of mouse macrophage proteome induced by *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vivo. **Parasitology Research**. v:109, n:6.
8. BRICEÑO, M.P.; *et al.* (2016) *Toxoplasma gondii* Infection Promotes Epithelial Barrier Dysfunction of Caco-2 Cells.; **J Histochem Cytochem**.; V.64, n. 8, p. 459-69.
9. TREVIZAN, A.R.; *et al.* (2016) Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats; **Experimental parasitology**, v. 165, p. 22.

10. ELE J. J., *et al.* (2016) Proteomic Profiling of Mouse Liver following Acute *Toxoplasma gondii* Infection. **PloS One**. v:11, n:3.
11. DHEIN, S. (1998) Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 19, n. 6, p. 229-241.
12. GAIETTA, G., *et al.* (2002) Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. **Science**. v.296, p.503-507, 2002.
13. SOSINSKY, G. E.; SOLAN, J. L.; GAIETTA, G. M.; NGAN, L.; LEE, G. J., MACKEY, M. R.; LAMPE, P. D.; 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.
14. GIEPMANS, B.N., (2004) Gap junctions and connexin-interacting proteins. **Cardiovascular Research**. v:62, n:2.
15. FUJIMOTO, J. SAWAMOTO, K.; OKABE, M.; OKANO, H.; YAMAMOTO, T.; Molecular cloning and characterization of focal adhesion kinase of *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology of the Cell**. v:8, 1997.
16. De Carvalho G.O.A.M., *et al* (2021) 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.
17. LAIRD, D.W.; *et al.* (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v:1711, n:2, p:172.
18. DE CARVALHO A.C., *et al.* (1998) Gap junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as consequence of protozoan infection. **Brain Res**. V. 790, n. 1-2, p. 304.
19. GOLDENBERG, R.C.; GONÇALVES, A.; DE CARVALHO, A.C.C. (1999). Gap junctions are specifically disrupted by *Trypanosoma cruzi* infection. **Current Topics in Membranes. Academic Press**. v. 49, p. 625-634.
20. ZOU, Z. *et al.* (2019) Cx43 inhibition attenuates sepsis-induced intestinal injury via downregulating ROS transfer and the activation of the JNK1/Sirt1/FoxO3a signaling pathway. **Mediators of Inflammation**.
21. ADESSE, D. *et al.* (2008) *Trypanosoma cruzi* induces changes in cardiac connexin43 expression. **Microbes Infect**. v. 10, n. 1, p. 8- 21.
22. DE CARVALHO, G.O.A.M. *et al.* (2021) Morphological evaluation of macrophage infected with *Toxoplasma gondii*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 4035.
23. TOYOFUKU T.; *et al.* (2001) c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. **The Journal of Biological Chemistry**. v:276, p. 1780-1788.
24. HUNTER, A.W.; JOURDAN, J.; GOURDIE, R.G., (2003) Fusion of GFP to the carboxyl terminus of connexin43 increases gap junction size in HeLa cells. **Cell Communication & Adhesion**. v:10, p:211-214.