

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**INFLUÊNCIA DA HEPARINA NA INVASÃO DE
CÉLULAS DA RETINA POR *Toxoplasma gondii***

ENEIDA CÉSAR MASTRANTONIO

Uberlândia / 2007

ENEIDA CÉSAR MASTRANTONIO

**INFLUÊNCIA DA HEPARINA NA INVASÃO DE
CÉLULAS DA RETINA POR *Toxoplasma gondii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Janethe Deolina Oliveira Pena

Co-orientadoras: Profa. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro

Profa. Dra. Neide Maria da Silva

Uberlândia / 2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M423i Mastrantonio, Eneida César, 1973-

Influência da heparina na invasão de células de retina por *Toxoplasma gondii* / Eneida César Mastrantonio. - 2007.

60 f. : il.

Orientadora: Janethe Deolina Oliveira Pena.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose - Teses. I. Pena, Janethe Deolina Oliveira. I. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU:

616.993.1

Dedicatória

À minha mãe (*Sonia*)

À meu pai (*Domingos*)

À meu marido (*Ernane*)

Aos meus irmãos (*Fernando e Eduardo*)

“De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando ...

A certeza de que é preciso continuar ...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

PORTANTO, DEVEMOS

Fazer da interrupção um caminho novo ...

Da queda, um passo de dança ...

Do medo, uma escada ...

Do sonho, uma ponte ...

Da procura, um encontro”.

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS, pela vida.

À Profa. Dra. *Janethe Deolina Oliveira Pena*, minha orientadora e amiga, que acreditou no meu potencial e com seus valiosos ensinamentos, sua convicção e tranqüilidade me fez acreditar que o impossível pode se converter em realidade.

À Profa. Dra. *Eloísa Amália Vieira Ferro*, minha co-orientadora, amiga e confidente, cuja inteligência, carinho e dedicação me inspirou no desenvolvimento do meu talento.

À Profa. Dra. *Maria Aparecida de Souza*, por seu profissionalismo, valiosos ensinamentos, amizade e apoio.

À Profa. Dra. *Neide Maria da Silva* cuja determinação, profissionalismo e amizade me incentivou e contribuiu para a realização deste trabalho.

***Aos animais*, que sem o poder de escolha participaram deste trabalho e contribuíram para o avanço da ciência.**

"Um homem é verdadeiramente ético apenas quando obedece sua compulsão para ajudar toda a vida que ele é capaz de assistir, e evita ferir toda a coisa que vive."

Albert Schweitzer

AGRADECIMENTOS

À todas as pessoas que de alguma forma participaram e contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

A Carla Duque Lopes, minha grande e fiel companheira e amiga nestes anos todos de trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, Cristiano, Fernanda, Miguel, Marta, Alexandre, Fernando Vinhal, Renata, Eduardo, Camila e Patrícia pelo carinho, companheirismo, apoio e trabalho em equipe.

A Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva por sua competência e disponibilidade incondicional em contribuir em várias etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo pela doação do anticorpo E9.

A todos os professores e colegas do Laboratório de Imunologia, pela amizade, ensinamentos, companheirismo e apoio.

As amigas do Laboratório de Histologia, Idessânia, Mariana, Belissa e Lorena, pela oportunidade de convivência, companheirismo e aprendizagem.

A Profa. Dra. Divina por ceder o Laboratório de Virologia para utilização da estufa de CO₂ e do fluxo laminar.

A todos os colegas, passados e presentes, da Pós-graduação pela oportunidade de convivência e aprendizagem.

A todo o pessoal do *Laboratório Laudo* (Uberlândia, MG), especialmente ao *Rogério* pela doação dos ovos fertilizados e pela imensa disponibilidade em contribuir para esta pesquisa.

Aos Profs. Drs. Anita H. Strauss-Takahashi e Hélio Takahashi (Universidade Federal de São Paulo) pelos anticorpos ST1 e C7.

Aos técnicos do Laboratório de Imunologia, *Júnior, Andréia e Marley* por contribuir com o funcionamento do Laboratório de Imunologia.

Aos secretários da Pós-graduação *Neto, Lucileide* e do Laboratório de Imunologia, *Max*, pela atenção e solicitude.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES por financiarem esse projeto.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar, em modelo *in vitro*, a influência de heparina na susceptibilidade de células da retina à infecção por *Toxoplasma gondii*. Culturas primárias de retina de embrião de galinha de 8 e 11 dias (E8 e E11) e de astrócitos da cabeça do nervo óptico humano foram mantidas em lamínulas durante aproximadamente uma semana, quando foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* por 24 horas. Fibroblastos de embrião de galinha e fibroblastos de prepúcio humano foram usados como controle. Parasitos foram pré-tratados com heparina e anticorpos anti-SAG-1, enquanto astrócitos humanos foram estimulados com IFN- γ antes e após a infecção, sendo realizada dosagem de nitritos no sobrenadante destas células. As taxas de infecção (invasão), o índice global de infecção (invasão) e as taxas de replicação celular, foram determinados pela contagem de, no mínimo, 100 células por condição experimental. Anticorpo monoclonal anti-heparina foi utilizado para determinar a distribuição de heparina na superfície das células. Pré-tratamento com heparina diminuiu o número de células E8 infectadas, porém, aumentou as taxas de replicação intracelular do parasito nos astrócitos humanos. A marcação para heparina foi discreta na maioria dos fibroblastos de embrião de galinha enquanto que, na cultura de retina, a grande maioria das células apresentou forte marcação. Astrócitos estimulados com IFN- γ mostraram aumento significativo no índice global de infecção, mas houve produção de nitritos somente em níveis basais nas células estimuladas. Células de retina E8 e astrócitos humanos foram mais susceptíveis à infecção por *T. gondii* que fibroblastos possivelmente pela distribuição diferencial de heparina na superfície dessas células facilitando a invasão pelo *T. gondii*. A inibição da replicação de *T. gondii* por IFN- γ em astrócitos humanos parece ser independente de mecanismos envolvendo a produção de nitritos.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, células da retina, astrócitos, heparina

ABSTRACT

The purpose of this work was to analyze, in an *in vitro* model, the influence of the heparin on the susceptibility of retinal cells to infection by *Toxoplasma gondii*. Primary cultures of retinas from chick embryos of 8 and 11 days-old and astrocytes from human optic nerve heads were maintained in coverslips for one week, when were infected with *T. gondii* tachyzoites for 24 hours. Chick embryo and human foreskin fibroblasts were used as controls for chick and human experiments, respectively. Parasites were pre-treated with heparin and anti-*T. gondii* surface antigen 1 (SAG-1) antibody and the astrocytes were stimulated with interferon gamma (IFN- γ) before and after infection. The number of cells infected with *T. gondii* and the number of parasites per cell were determined by counting at least 100 cells in each experimental condition. Monoclonal anti-heparin antibody was used to determine the distribution of heparin on the surface of cells. Pre-treatment with heparin increased the rates of replication E8 cells, while, in human astrocytes heparin pre-treatment decreased intracellular parasite replication. The labeling for heparin was more discrete in the chick embryo fibroblasts, while in the retinal cells there was strong labeling. Astrocytes stimulated with IFN- γ showed a little difference in the rates of infection and there was no detectable nitric oxide (NO) production in the stimulated cells. Retinal cells of chick embryos (E8) were more susceptible to infection by *T. gondii* than fibroblasts possibly by differential distribution of heparin on the surface of these cells, which may facilitate adhesion and invasion by *T. gondii*. The inhibition of the replication of *T. gondii* by IFN- γ in human astrocytes probably is independent from mechanisms involving NO production.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, retinal cells, astrocytes, heparin

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. O parasito.....	11
1.2. Interação parasito-hospedeiro.....	14
1.3. Patologia da toxoplasmose ocular.....	18
1.4. Tipos celulares.....	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. Geral.....	24
2.2. Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Parasitos.....	25
3.2 Cultura de células.....	25
3.2.1 Células da retina de embrião de galinha	25
3.2.2. Fibroblastos de embriões de galinha	26
3.2.3. Astrócitos humanos	27
3.2.4. Fibroblastos humanos	27
3.3. Infecção por <i>T. gondii</i>	27
3.3.1. Ensaio de adesão/invasão de células da retina de embrião de galinha e astrócitos humanos por <i>T. gondii</i>	28
3.3.2. Tratamento com heparina solúvel.....	29
3.3.3. Tratamento com anticorpo monoclonal anti-SAG1	29
3.3.4 Tratamento com IFN- γ	29
3.4. Ensaio de imunofluorescência indireta	30
3.5. Dosagem de nitritos	31
3.6. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Ensaio de adesão/invasão de células da retina por <i>T. gondii</i>	32
4.2. Tratamento com heparina solúvel.....	36
4.3. Tratamento com anticorpo monoclonal anti-SAG1	40
4.4. Ensaio de imunofluorescência	42
4.5. Tratamento com IFN- γ	43
4.6. Produção de nitritos	43
5. DISCUSSÃO	46-49
6. CONCLUSÕES	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. O parasito

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório comumente encontrado no homem e em animais (REY, 2002). Estima-se que aproximadamente 500 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo (DENKERS; GAZZINELLI, 1998) e, em indivíduos imunocompetentes, a infecção é geralmente assintomática (LUFT; REMINGTON, 1992; BOOTHROYD; GRIGG, 2002) exceto no olho, onde causa uveíte posterior em cerca de 30-50% dos casos, dependendo da localização geográfica (HENDERLY et al., 1987; GLASNER et al., 1992). A toxoplasmose é uma patologia importante em pacientes imunocomprometidos e em fetos, sendo que a doença congênita origina a maioria dos casos de toxoplasmose ocular (PERKINS, 1973).

Morfológicamente, *T. gondii* assemelha-se às demais células eucarióticas apresentando núcleo, mitocôndrias, complexo de Golgi, lisossomos e retículo endoplasmático. Possui uma forma alongada com as extremidades arqueadas, lembrando o formato de uma banana (REY, 2002). No entanto, além das organelas típicas dos seres eucariontes, somente *T. gondii* e os outros membros do filo Apicomplexa possuem complexo apical com compartimentos secretórios especializados na invasão e adesão do parasito à célula hospedeira, conhecidos como grânulos densos (GD), micronemas e roptrias (CARRUTHERS, 1999).

T. gondii apresenta três formas infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. A infecção no homem é adquirida principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos liberados nas fezes de gatos e ingestão de alimentos mal cozidos ou carnes cruas contendo cistos teciduais (JONES et al., 2001; MONTOYA,

2004). Porém, pode ser transmitida também via transplacentária, ou através de órgãos transplantados e acidentes laboratoriais (JONES et al., 2001).

As espécies do gênero *Felis* e *Lynx*, mais particularmente o gato, são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, e a replicação do parasito ocorre no intestino desses animais, resultando em produção de oocistos que são eliminados nas fezes dos gatos. Após a esporulação, na qual permanece no ambiente por 1-21 dias, oocistos contendo esporozoítas são infectantes quando ingeridos por hospedeiros mamíferos e se transformam em taquizoítas (REY, 2002; MONTOYA, 2004).

A forma taquizoíta está relacionada principalmente com a disseminação da infecção para diferentes tecidos do hospedeiro, incluindo sistema nervoso central (SNC), olhos, músculos esquelético e cardíaco, e placenta. Taquizoítas multiplicam-se rapidamente dentro de um vacúolo parasitóforo nas células infectadas. As taxas de invasão e multiplicação dos taquizoítas dependem da cepa de *T. gondii*, da célula infectada e da competência imunológica do paciente (SILVA et al., 1982). Quando as células hospedeiras se rompem, os taquizoítas liberados vão rapidamente invadir novas células, generalizando a infecção e podendo levar à morte do hospedeiro (DENKERS; GAZZINELLI, 1998).

A forma bradizoíta está mais relacionada com a propagação da infecção entre diferentes hospedeiros, e com episódios de reativação da toxoplasmose em indivíduos cronicamente infectados e imunossuprimidos (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Bradizoítas são morfológicamente semelhantes aos taquizoítas, mas sua multiplicação é lenta, expressam moléculas estágio-específicas, e são funcionalmente diferentes. Cistos teciduais contêm de centenas a milhares de bradizoítas e se formam nas células hospedeiras no cérebro, músculo esquelético e cardíaco, permanecendo por toda a vida do hospedeiro infectado e, na presença de um sistema imune apto, estas formas císticas geralmente não estão associadas com doença clínica (MONTOYA, 2004).

T. gondii apresenta três linhagens clonais principais designadas como tipo I, II e III, nas quais se diferem na virulência e no padrão epidemiológico de ocorrência. Normalmente, as cepas se dividem em altamente virulentas (tipo I), relativamente virulentas (tipo II) ou brandas (tipo III) (HOWE; SIBLEY, 1995). Novas linhagens clonais estão sendo descritas na literatura como cepas exóticas ou atípicas pelo fato de seus genótipos serem diferentes ou até mesmo serem uma mistura das três linhagens já existentes (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Várias cepas isoladas de pacientes com AIDS na América do norte são tipo II. Cepas tipo I e tipo II têm sido encontradas em pacientes com doença congênita, e em animais a maioria das cepas isoladas é do genótipo III (HOWE; SIBLEY, 1995). No Brasil, a cepa tipo I é encontrada frequentemente nos casos de toxoplasmose ocular (VALLOCHI et al., 2005). Em Erechim, onde há uma prevalência de 17% de casos de toxoplasmose ocular, a cepa tipo I é predominante (JONES et al., 2006). Acredita-se que esta alta taxa pode ser devido a uma infecção aguda após o nascimento, porque a taxa de infecção em crianças e jovens é baixa nesta região do Brasil (SILVEIRA et al., 2001).

É importante salientar então, que variações na apresentação clínica e severidade da doença em indivíduos susceptíveis, são atribuídas a diversos fatores incluindo a genética heterogênea do hospedeiro e o genótipo do parasito responsável pela infecção (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Além disso, Khan e colaboradores (2006) mostraram que a constituição genética de *T. gondii* é mais complexa e sugere que genótipos únicos ou divergentes podem contribuir para diferenças clínicas da toxoplasmose em diferentes localidades.

T. gondii é há muito tempo reconhecido por causar doença grave em dois principais grupos de indivíduos. Primeiro, os indivíduos imunocomprometidos, nos quais lesões neurológicas e lesões oftalmológicas podem ocorrer. Segundo, aqueles expostos a uma

infecção primária durante a gestação podendo transmitir a infecção via placentária para o feto, resultando em sérias conseqüências, desde aborto até sintomas neurológicos e oculares graves. Recentemente, um terceiro grupo de indivíduos de alto risco em desenvolver sintomas de doença grave foram identificado: pessoas saudáveis expostas a algumas cepas do parasito, particularmente prevalentes na América do Sul, onde indivíduos infectados podem apresentar envolvimento pulmonar e esplenomegalia (CARME et al., 2002). Havendo então, uma relação entre cepas atípicas e doença ocular, pode-se suspeitar que a maior prevalência de toxoplasmose ocular na América do Sul seja causada por essas cepas exóticas (KHAN et al, 2006; VALLOCHI et al., 2005). Entretanto, aumentam as evidências de que uma significativa porção de pacientes com toxoplasmose ocular pode ter adquirido a doença pós-natal e na ausência de imunossupressão. No entanto, na rotina clínica uma diferenciação entre doença congênita e adquirida é problemática e normalmente não mais que sugestiva (JONES et al., 2006).

1.2. Interação parasito-hospedeiro

Os membros do filo Apicomplexa, exibem um processo similar de invasão no qual, antes de invadir, o parasito desliza sobre o substrato (KEELEY, SOLDATI, 2004). Diferentes tipos de proteínas são usados em cada etapa do processo, o qual resulta na formação de uma interface ligante íntima entre o parasito e a célula-alvo (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007) e na entrada do parasito através de sua região anterior, seguindo pela protrusão do conóide, modificação da membrana da célula hospedeira e secreção de micronemas e roptrias (WERK, 1985; CARRUTHERS; SIBLEY, 1997)

A superfície de taquizoítas de *T. gondii* é coberta por uma família de antígenos de superfície (“surface antigen”, SAGs) e proteínas de seqüência relacionada à SAG (SRS), havendo mais de 150 SAGs ou genes SRS no genoma de *Toxoplasma gondii* (JUNG et al.,

2004). No entanto, somente alguns são reconhecidos por serem expressos em taquizoítas e destes, seis antígenos de superfície (SAGs 1-3 e SRSs 1-3) predominam na superfície do parasito (LEKUTIS et al., 2001).

Algumas evidências sugerem que SAGs participam na aderência inicial de *T. gondii* às células hospedeiras. As proteínas de superfície do parasito, SAG1 (P30), SAG2 (P22) e SAG3 (P43) já foram descritas como mediadores da ligação desse protozoário à célula hospedeira (MINEO et al., 1993; MINEO; KASPER, 1994).

No entanto, há fatos paradoxos no que diz respeito ao papel de SAGs na aderência, pois em culturas *in vitro*, mutantes deficientes em SAG-1 são mais hábeis em invadir as células hospedeiras que os parasitos selvagens (GRIGG, BOULEY apud CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

Em trabalho publicado recentemente com modelo murino para estudo da toxoplasmose ocular, concluiu-se que SAG-1 não parece participar das lesões agudas à retina induzidas por *Toxoplasma* (CHARLES et al., 2007).

Durante a invasão forma-se a junção de movimento com participação de proteínas de micronemas e roptrias e, durante a formação do vacúolo parasitóforo, há secreção de roptrias e grânulos densos (ALEXANDER et al., 2005).

A existência de uma etapa aderente envolvendo especificamente a superfície apical do parasito foi inicialmente relatada através de experimentos utilizando a citocalasina D, (CytD), um antagonista de actina, que impede o deslizamento e a penetração ativa do parasito na célula hospedeira. *T. gondii* tratado com CytD possui alta capacidade de ligação às células hospedeiras, porém, é incapaz de invadir a célula-alvo. SAGs provavelmente não participam desta interação polarizada por serem distribuídos homogeneamente por toda a superfície do parasito (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Já as proteínas micronemais, entre elas as conhecidas como MICs, produto de

pequenas organelas secretórias situadas abaixo do conóide, são descritas como sendo de importância fundamental no processo de aderência (CARRUTHERS et al, 1999). Parasitos deficientes em MIC2 não conseguem invadir células hospedeiras e, para o parasito, a deleção do gene MIC2 é letal (HUYNH et al., 2003; HUYNH et al., 2004).

Várias proteínas MIC possuem domínios aderentes conservados (trombospondina (TSP)-“like”, fator de crescimento epidermal (EGF)-“like”, lectina-“like” e outros) que são conhecidos por mediar a interação proteína-proteína ou carboidrato-proteína em outros sistemas (SOLDATI et al., 2001). Experimentalmente, o acúmulo de proteínas de micronemas pode ser mimetizado utilizando agonistas de cálcio, e bloqueado utilizando antagonistas de cálcio, com uma diminuição correspondente da aderência (CARRUTHERS et al., 1999).

Estudos anteriores também indicaram papéis satisfatórios para MICs na aderência durante a infecção. Parasitos deficientes tanto em MIC1 ou MIC3 apresentaram atenuação moderada em camundongos, no entanto, parasitos deficientes tanto em MIC1 e MIC3 não são virulentos e falham em produzir infecção letal (CEREDE et al., 2005).

O receptor da célula hospedeira deve ser comum a diferentes tipos celulares ou provavelmente existem múltiplos receptores, já que o parasito invade praticamente qualquer tipo celular. Sabe-se que o parasito liga-se à laminina que, por sua vez liga-se a receptores β_1 -integrina da célula hospedeira. Experimentos anteriores sugerem que proteoglicanos sulfatados seriam os principais receptores celulares para *T. gondii* (SIBLEY, 1998; ORTEGA-BARRIA; BOOTHROYD, 1999), que reconheceria essas moléculas através das proteínas SAG-3 ou MIC2 presentes na superfície do parasito. A partir desta ligação com proteoglicanos sulfatados, ocorreria então a invasão da célula hospedeira pelo parasito. Jacquet e colaboradores (2001) demonstraram que SAG-3, e não SAG-1, é capaz de se ligar especificamente a proteoglicanos sulfatados. Entretanto,

bloqueando-se SAG-3, não se conseguiu inibir totalmente a adesão do parasito, sugerindo que há outros sistemas envolvidos na adesão e invasão parasitárias.

Uma variedade de cadeias de glicosaminoglicanas (GAGs) sulfatadas podem funcionar como receptores para adesão de *T. gondii* e fixação às células hospedeiras durante a invasão. A diminuição da aderência do parasito já foi observado em células hospedeiras com deficiência na síntese e/ou sulfatação de heparina, heparan sulfato e sulfato de condroitina. Glicosaminoglicanas solúveis exibiram uma inibição do deslizamento do parasito dose-dependente, sugerindo um papel para o heparan sulfato no movimento e migração de *Toxoplasma* através da matriz extracelular (CARRUTHERS et al., 2000).

O heparan sulfato é uma glicosaminoglicana polimerizada de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e ácido glucurônico (GlcA) presa a uma porção proteica central (GROBE et al., 2002; ESKO; SELLECK, 2002). Proteoglicanas contendo heparan sulfato podem ser tanto transmembrânicas, quanto ligadas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) ou ainda podem ser proteínas secretadas. No complexo de Golgi, as cadeias glicídicas sofrem uma série de modificações, incluindo N-deacetilação/ N-sulfatação de resíduos de GlcA, epimerização de D-GlcA a L-ácido idurônico (IdoA), e O-sulfatação. N-deacetilação/N-sulfatação de resíduos de GlcA pelas enzimas N-deacetilase/ N-sulfatase (NDST) é o passo inicial na modificação do heparan sulfato. Sulfatações subsequentes ocorrem em sequências próximas a resíduos de glucosaminas N-sulfatadas, resultando em aglomerados de unidades de açúcares sulfatados. Células de mamíferos expressam quatro NDSTs. NDST1 e NDST2 são de expressão ubíqua, enquanto NDST3 e NDST4 são expressas somente durante o desenvolvimento e em cérebro adulto (AIKAWA; ESKO, 1999; AIKAWA et al., 2001). Ácidos siálicos são encontrados na porção terminal das cadeias glicanas em glicoproteínas ou glicolípídeos. Diminuição de cadeias de heparan sulfato ou ácido siálico

de glicoconjugados celulares resulta em significativa redução de infecção por *T. gondii* *in vitro* (BAIA; ESKO, 1996).

1.3. Patologia da toxoplasmose ocular

A retina é provavelmente o único tecido humano onde se desenvolve lesão ativa pelo *Toxoplasma* em indivíduos adultos imunocompetentes, causando sérias conseqüências visuais, inclusive a cegueira. Mesmo na fase cicatricial inativa, a toxoplasmose ocular está associada com defeitos permanentes no campo visual em mais de 94% dos casos, sendo que desse porcentual, dois terços dos indivíduos apresentam defeitos graves e em 48% há diminuição na acuidade visual (SCHERRER et al., 2007).

O primeiro alvo da toxoplasmose ocular é a retina neural, onde o parasito causa inflamação necrosante, e na fase inativa, forma cistos intracelulares (NICHOLSON; WOLCHOK, 1976; GAZZINELLI et al., 1994). A presença de taquizoítas livres e cistos dentro de células do epitélio pigmentar da retina (EPR) foram também observados (NICHOLSON, WOLCHOK, 1976). A maioria dos casos de doença congênita só desenvolve a lesão ocular (retinocoroidite) mais tardiamente no período pós-natal, sendo que 80% desses pacientes terão pelo menos um episódio de retinocoroidite até os 20 anos de idade (KOPPE, 1986).

Retinocoroidite necrosante é a característica clínica mais marcante da toxoplasmose ocular. É comumente acompanhada por uveíte posterior difusa e reação inflamatória do vítreo. A lesão ocular típica causada por *T. gondii* é oval ou redonda, situada na retina neural. Nos estágios ativos, as lesões apresentam uma aparência cinza-esbranquiçada e pode estar associada com edema de retina. Quando a inflamação desaparece, ocorre uma

atrofia retiniana e coroidal, usualmente com pigmentação das lesões (VALLOCHI et al., 2005).

Danos ao tecido ocular são considerados como resultado da combinação de fatores imunes e do próprio parasito. Invasão inicial do olho pelo parasito contribui para a quebra da barreira hemato-ocular que então facilita a translocação de células imunes para o interior do olho, que é classicamente um sítio de privilégio imunológico e normalmente não permite a entrada e sobrevivência de células T dentro do tecido ocular. No entanto, mecanismos auto-imunes têm sido sugeridos como tendo papel na inflamação durante a toxoplasmose ocular (VALLOCHI et al., 2005; FERGUSON; GRIFFITH, 2006; JONES et al., 2006).

Sabe-se que, imunidade persistente é essencial para controlar danos teciduais no sistema nervoso central, o principal sítio de persistência do parasito durante infecção latente. Em indivíduos imunocomprometidos, a reativação da infecção pode resultar em encefalite toxoplásmica fatal (ISRAELSKI; REMINGTON, 1993).

A secreção de interferon gama (IFN- γ), a principal citocina envolvida no controle do parasitismo, é responsável por estabelecer infecção crônica assintomática por *T. gondii* no sistema nervoso central (GAZZINELLI et al., 1991; STOLL et al., 2000), tanto por meio de células residentes como não residentes do sistema nervoso central (SNC). De fato, a resistência do hospedeiro parece ser dependente da presença de receptores de IFN- γ em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. Contudo, a participação de células do SNC na resposta a IFN- γ , é vista por ser altamente relevante (YAP; SHER, 1999; HALONEN et al., 2001). Entretanto, paradoxalmente, a presença de citocinas do perfil Th1 no parênquima cerebral pode ser prejudicial pela intensa atividade da microglia resultando em produção de óxido nítrico (NO) e de outros metabólitos tóxicos (YAP; SHER, 1999; KANG; SUZUKI, 2001). Mediadores pró-inflamatórios tais como o IFN- γ , fator de

necrose tumoral (TNF- α) e NO têm atividade neurotóxica *in vivo* (GIOVANNONI et al., 1998) e *in vitro* (CHAO et al., 1995). Embora a ativação da microglia garanta proteção contra infecções cerebrais, paradoxalmente ela pode causar danos teciduais graves (ROZENFELD et al., 2003).

IFN- γ pode também ativar astrócitos para inibir o crescimento de *T. gondii*. Em astrócitos murinos e células da microglia, o IFN- γ em combinação com lipopolissacarídeo (LPS) ou interleucina-1 (IL-1) mostrou efeito inibitório na replicação de *T. gondii* (HALONEN et al., 1998). O mecanismo da atividade anti-*Toxoplasma* mediada por IFN- γ em astrócitos murinos parece ser independente de mecanismos previamente demonstrados em outras células como fibroblastos humanos, por exemplo, mecanismos envolvendo NO, privação de triptofano, intermediários reativos do Oxigênio e privação de Ferro (HALONEN; WEISS, 2000).

IFN- γ é conhecido por exercer seu efeito pela ativação de genes reguladores, dos quais mais de 200 foram identificados (BOEHNE et al., 1997), sendo um deles o IGTP, gene regulador de IFN- γ (TAYLOR et al., 1996). Halonen e colaboradores (2001) mostraram que o IGTP realiza um papel central na inibição de *T. gondii* induzida por IFN- γ em astrócitos murinos. Estas observações sugerem que o efeito de IFN- γ e de citocinas na multiplicação intracelular de *T. gondii* em sistemas *in vitro* parece ser dependente do tipo celular utilizado como modelo.

No entanto, em alguns tipos celulares, o IFN- γ parece falhar em produzir um efeito anti-parasitário. Células BeWo trofoblásticas na presença de IFN- γ e L-triptofano são mais susceptíveis à infecção por *T. gondii* (OLIVEIRA et al., 2006). Schluter e colaboradores (2001) demonstraram que neurônios cerebelares murinos estimulados com IFN- γ e/ou fator de necrose tumoral (TNF) falharam em produzir um efeito inibitório na invasão e crescimento de *T. gondii*.

Em pesquisas com células de glioblastoma humano demonstrou-se que o efeito inibitório da ação do IFN- γ no controle de *T. gondii* foi possivelmente devido à ligação desta citocina às moléculas de heparina presentes na superfície dessas células (DAUBENER et al., 1995).

1.4. Tipos celulares

Um fato interessante quanto à infecção por *T. gondii* é o chamado "tropismo" pelo sistema nervoso central. Cistos intracelulares são localizados preferencialmente no cérebro, tecido muscular e cérebro, mas a base biológica para esta localização preferencial é muito pouco entendida. Estudos sugerem um possível *status* imunológico específico do cérebro (ou a existência de propriedades específicas das células cerebrais, ou ambos (HUNTER; REMINGTON, 1994).

In vitro, neurônios de camundongos podem ser infectados por *T. gondii* tão eficientemente quanto fibroblastos, resultando na formação de cistos (FISCHER et al., 1997). Entretanto, Fagard e colaboradores (1999) demonstraram que neurônios de hipocampo de rato foram infectados por *T. gondii* com menos eficiência em que foram os astrócitos. Esta discrepância pode ser devido à cepa de *T. gondii* usada ou as espécies de células hospedeiras (rato e homem *versus* camundongo).

Schlüter e colaboradores (2001) demonstraram, em estudos de microscopia eletrônica, que em camundongos infectados com *T. gondii* os neurônios são as principais células alvo do parasito, embora astrócitos e micróglia possam também ser infectados. Níveis de infecção de neurônios foram mais altos que os encontrados por Faguard e colaboradores (1999).

No entanto, Creuzet e colaboradores (1998) concluíram que neurônios do hipocampo de ratos infectados com *T. gondii* são muito menos infectados que as células da glia, possivelmente porque neurônios não se dividem ou porque necessitam de um receptor ciclo celular dependente para *T. gondii* nas células hospedeiras.

Pesquisas de secções de cérebro de camundongos cronicamente infectados mostraram a ocorrência de cistos em uma grande variedade de tipos celulares, mas preferencialmente localizados em neurônios. Em um paciente que teve morte por toxoplasmose cerebral, foram encontrados cistos nas células da glia, células da parede vascular e neurônios (FERGUSON; HUTCHINSON, 1987). Estudos de infecção de cultura celular por *T. gondii* demonstraram que as células da micróglia em cultura são tão infectadas (CHAO et al., 1993) quanto astrócitos (JONES et al., 1986). Não se sabe se *T. gondii* penetra essas áreas do SNC facilmente ou se esses sítios imunologicamente privilegiados não erradicam o parasito (FERGUSON; GRIFFITH, 2006)

Ao contrário do restante do sistema nervoso central, na retina ocorre reativação da infecção por *T. gondii* mesmo em indivíduos imunocompetentes, causando importante deficiência visual, pela retinocoroidite que se desenvolve principalmente na região mais nobre da retina, chamada mácula.

Culturas agregadas de células de retina são sido utilizadas por vários pesquisadores com o intuito de definir fenotipos moleculares *in vitro*. Este sistema de cultura também tem sido usado para o estudo de mecanismos de sinaptogenese e histogenese que ocorrem durante desenvolvimento da retina (DE MELLO, 1984; MORAES et al., 2004).

Tropismo de diferentes microorganismos para tipos celulares particulares e/ou sítios teciduais específicos é um fenômeno biológico longamente reconhecido, entretanto, mecanismos ligados a isso são pouco entendidos, portanto, este trabalho justifica-se pela necessidade de estudos que estabeleçam os fatores de maior susceptibilidade da retina ao *T.*

gondii ou “tropismo” de *T. gondii* pelo sistema nervoso central, mais especificamente à retina. Desta forma, melhores abordagens diagnósticas e/ou terapêuticas poderão ser desenvolvidas para o benefício dos pacientes com toxoplasmose ocular.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Determinar a influência da heparina na susceptibilidade de células da retina à infecção por *Toxoplasma gondii*.

2.2. Específicos

- Estudar a susceptibilidade de células da retina de embrião de galinha de 8 e 11 dias de incubação e de astrócitos humanos à infecção por taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii*, analisando a taxa de infecção (porcentagem de células infectadas), e de replicação intracelular do parasito (número de parasitos por célula infectada) e o índice global de infecção (número total de parasitos pelo total de células infectadas).
- Analisar o papel de moléculas receptoras do hospedeiro, como heparina/heparan sulfato e do parasito, como *Toxoplasma gondii* “surface antigen” 1 (SAG-1), envolvidos na adesão/invasão do parasito em células da retina de embrião de galinha e astrócitos humanos.
- Analisar a influência do tratamento com interferon- γ (IFN- γ) sobre as taxas de invasão e replicação de *T. gondii* em culturas primárias de astrócitos humanos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitos

Parasitos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* foram mantidos por passagem em cavidades peritoneais de camundongos Swiss do Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia, segundo anteriormente descrito por Mineo e colaboradores (1980). Suspensões de taquizoítas foram inoculadas intraperitonealmente em lotes de camundongos e, após 48 horas da inoculação, os parasitas foram recuperados por lavagem peritoneal com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril. A suspensão resultante dessa lavagem foi centrifugada duas vezes a 1000 x g por 10 minutos. O sedimento contendo taquizoítas foi ressuspensão em meio de cultivo celular (Meio Dulbecco MEM (DMEM), Cultilab, Campinas, Brasil) e contados em câmara de Neubauer com Azul de Tripán (1%) para análise da viabilidade dos parasitos.

3.2 Cultura de células

3.2.1 Células da retina de embrião de galinha

Ovos SPF ("Specific Pathogen Free") fertilizados da raça "White Leghorn" foram obtidos do Laboratório Laudo em Uberlândia, MG e incubados em condições úmidas a 37°C. Embriões de galinha de 8 e 11 dias de incubação (E8 e E11) foram utilizados para a cultura de células da retina (CRISANT et al., 1995). Os ovos foram quebrados assepticamente e os embriões retirados, sendo imediatamente decapitados. A seguir os globos oculares foram cuidadosamente dissecados em PBS estéril para separação das

retinas livres de epitélio pigmentar. Foram feitas duas lavagens em DMEM e as células foram sedimentadas a 1000x g durante cinco minutos cada e logo após, os tecidos foram incubados por 10 minutos a 37°C em tubo de polipropileno de 15 ml (Corning, USA). Em seguida, as retinas foram tratadas com tripsina a 0,25% durante 20 minutos a 37°C. Foi realizada uma centrifugação a temperatura ambiente e posteriormente 3 lavagens em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, Brasil) a 1000 x g por cinco minutos cada. A seguir foram feitas dissociações por pipetagem branda, nova centrifugação e finalmente as células foram ressuspensas em DMEM e contadas em câmara de Neubauer. As células da retina foram plaqueadas em lamínulas de vidro de 13 ou 18 mm de diâmetro em placas de cultivo celular de 24 poços à concentração de 5×10^5 células/cm² e mantidas em meio DMEM suplementado com antibiótico-antimicótico [100 U/ml de penicilina e 200 µg/ml de estreptomicina e 20 µg/ml de anfotericina B], Cultilab, Campinas, Brasil) e 5% de SFB, mantidas em estufa a 37°C, úmida, e 5% de CO₂ por aproximadamente uma semana.

3.2.2. Fibroblastos de embriões de galinha

Os fibroblastos foram obtidos através de cultura primária a partir de explantes da pálpebra de embriões. As células foram plaqueadas em lamínulas de vidro de 13 ou 18 mm de diâmetro em placas de cultivo celular de 24 poços à concentração de 4×10^5 células/cm² e mantidas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de SFB contendo 0,37% de bicarbonato de sódio, e antibiótico-antimicótico como acima descrito.

3.2.3. Astrócitos humanos

Os astrócitos humanos foram obtidos através de explantes da cabeça do nervo óptico de doadores de córnea coletados dentro de 24 horas *pós-mortem* no MG Transplantes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, MG. O pólo posterior dos olhos humanos foi dissecado, e a cabeça do nervo óptico removida e partida em quatro partes, as quais foram colocadas em frascos de cultura de 25 cm². As células foram cultivadas em meio DMEM com 1 g de glicose, suplementado com 20% de SFB, 0,37% de bicarbonato de sódio e antibiótico-antimicótico (KOBAYASHI et al., 1997). Para os experimentos foram utilizadas as culturas entre a terceira e quinta passagens, quando mais de 90% das células eram positivas para o marcador GFAP (“glial fibrillary acidic protein”).

3.2.4. Fibroblastos humanos

Fibroblastos humanos (“human foreskin fibroblasts) (HFFs) foram adquiridos do laboratório ATCC, EUA (“American Type Culture Collection”, #CRL-2429). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% SBF contendo 0,37% de bicarbonato de sódio e antibiótico-antimicótico.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisas.

3.3. Infecção por *T. gondii*

A infecção por *Toxoplasma gondii* foi realizada no sexto dia de cultivo celular, na concentração de 1 parasito/célula, durante 24 horas. Para observação microscópica, as lamínulas com as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS por uma hora e

coradas com Azul Toluidina a 1% (Sigma Chemical CO., Brasil) durante dois a dez segundos, seguidos por lavagem em água destilada e montagem com glicerina.

Após contagem das células em câmara de Neubauer, os resultados foram expressos através dos seguintes parâmetros de infecção:

1. Taxa de invasão: número de células infectadas por 100 células examinadas (%)
2. Taxa de replicação intra-celular: número de parasitos por célula infectada
3. Índice global de infecção: número total de parasitas pelo total de células infectadas

Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata e os resultados foram determinados através das duas observações.

3.3.1. Ensaios de adesão/invasão de células da retina de embrião de galinha e astrócitos humanos por *T. gondii*

Culturas confluentes das células de retina de embrião de galinha (E8 e E11), bem como de astrócitos humanos, foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* no sexto dia de cultivo celular na concentração de um parasito/célula por 24 horas. As lamínulas com as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS por uma hora e coradas com Azul Toluidina a 1% durante dois a dez segundos, seguidos por lavagem em água destilada e montagem com glicerina.

Como controle, fibroblastos de galinha e HFFs foram infectados nas mesmas condições acima descritas.

3.3.2. Tratamento com heparina solúvel

Culturas confluentes das células da retina de embrião de galinha (E8 e E11), bem como de astrócitos humanos foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* no sexto dia de cultivo na concentração de um parasito/célula por 24 horas. Os parasitos foram pré-tratados ou não (controle) com 5 mg/ml de heparina solúvel (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) durante 40 minutos (CARRUTHERS et al., 2001).

3.3.3. Tratamento com anticorpo monoclonal anti-SAG1

Neste estudo, foi utilizado anticorpo monoclonal anti-SAG-1 para determinar se a proteína SAG1 pode interferir com a infecção das células da retina de embrião de galinha (E8) por *T. gondii*.

No quinto dia após o plaqueamento, as células de retina E8 foram infectadas com parasitos previamente tratados durante 30 minutos com sobrenadante de anticorpo monoclonal anti-SAG1 (Clone E9 do Laboratório de Imunoparasitologia da UFU) ou somente com meio de cultura. As células foram incubadas com *T.gondii* em uma concentração de 1 parasito por célula durante 24 horas a 37°C.

3.3.4 Tratamento com IFN- γ

Culturas confluentes de astrócitos humanos em lamínulas foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* no sexto dia de cultivo na concentração de um parasito por célula por 24 horas. Vinte e quatro horas pré-infecção com *T. gondii* e três horas pós-infecção, os

astrócitos foram tratados com 100 U/ml de IFN γ recombinante humano (PeproTech Inc, Rocky Hill, EUA) (OLIVEIRA et al., 2006) ou meio de cultura como controle. Após as 24 horas de infecção, e três lavagens com PBS estéril, as lamínulas foram fixadas em paraformaldeído a 4% e coradas com Azul de Toluidina.

3.4. Ensaio de imunofluorescência indireta

Foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta com o objetivo de determinar a localização de moléculas de heparina nas células da retina de embrião de galinha (E8 e E11) em comparação com fibroblastos de galinha, utilizando o anticorpo monoclonal anti-heparina (mAb ST1) fornecido pelo Laboratório do Departamento de Bioquímica da UNIFESP, SP e realizado segundo protocolo de OLIANI e colaboradores (1997). No quinto dia após o plaqueamento das células, as lamínulas foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS durante uma hora, lavadas com água destilada e incubadas com 200 μ L de soroalbumina (BSA, fraction V, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) a 5% para bloquear os sítios inespecíficos, durante 1 hora a temperatura ambiente. As lamínulas foram então incubadas com anticorpo primário monoclonal IgM de camundongo anti-heparina (mAb ST1) ou anti-lipofosfoglicana de *Leishmania* (controle, clone C7) e, como secundário, IgG biotinizada de coelho anti-IgM de camundongo. A revelação foi realizada com streptoavidina-fluoresceína + DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen, Brasil) e leitura em microscópio fluorescente.

3.5. Dosagem de nitritos

As concentrações de nitritos nos sobrenadantes das culturas de células de astrócitos humanos tratados com IFN- γ ou somente com meio de cultura foram determinados pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). Foram adicionados 100 μ l das amostras em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo redondo (Corning glass works, Corning, N.Y, EUA) e a reação foi realizada em triplicata. Em seguida, foram acrescentados 100 μ l do reativo de Griess, constituído por uma mistura de 1:1 de sulfanilamida a 1% (Sigma) em H₃PO₄ a 2.5% e de uma solução de dihidrocloreto de naftiletilenodiamina a 0.1% (NEED, Sigma). A curva padrão foi obtida a partir de 200 μ M de nitrito de sódio (Vetec) até 0.1903 μ M, por diluição seriada na base dois, e o branco da reação foi estabelecido com água destilada. Após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da reação a 570 nm em fotolorímetro (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories International, Lugano, Suíça). A concentração de nitrito de cada amostra foi determinada de acordo com a reta da regressão linear, obtida a partir da curva padrão, utilizando-se o programa Microplate Manager, versão 4.0 (Hercules, EUA).

3.6. Análise estatística

Para determinação das taxas de invasão (porcentagem de células infectadas), os dados foram expressos como porcentagem média e intervalo de confiança de 95%, e para análise das diferenças estatísticas entre as porcentagens foi utilizado o teste de qui-quadrado. O número total de parasitos pelo total de células infectadas (índice global de infecção) e número de parasitos por célula infectada (taxa de replicação intra-celular) foram expressos

como média e desvio padrão, e as diferenças estatísticas entre as médias foram determinadas através de teste *t* de Student não-pareado ou teste de Tukey, quando apropriado. Para as análises estatísticas foi utilizado o Graph Pad Software v.4 (San Diego, USA) e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio de adesão/invasão de células da retina por *T. gondii*

Os ensaios de adesão/invasão foram realizados com o objetivo de verificar a susceptibilidade de células da retina e astrócitos humanos à infecção por *T. gondii* comparados com fibroblastos. No presente trabalho, houve um aumento significativo na porcentagem de células infectadas, no número total de parasitos pelo total de células infectadas e no número médio de parasitos por célula da retina (E8) e astrócitos humanos quando comparados com os grupos controles (fibroblastos) (Figuras 1, 2 e 3, A-C). No entanto, com relação às células da retina E11, não houve diferença significativa na porcentagem de células infectadas e no número total de parasitos pelo total de células infectadas quando comparados aos fibroblastos de galinha, mas somente no número médio de parasitos por célula (Figura 1, A-C). Além disso, células da retina de E8 apresentaram significativamente maior susceptibilidade que E11, como demonstrado por todos os parâmetros de infecção analisados (Figura 1 e 2, A-C).

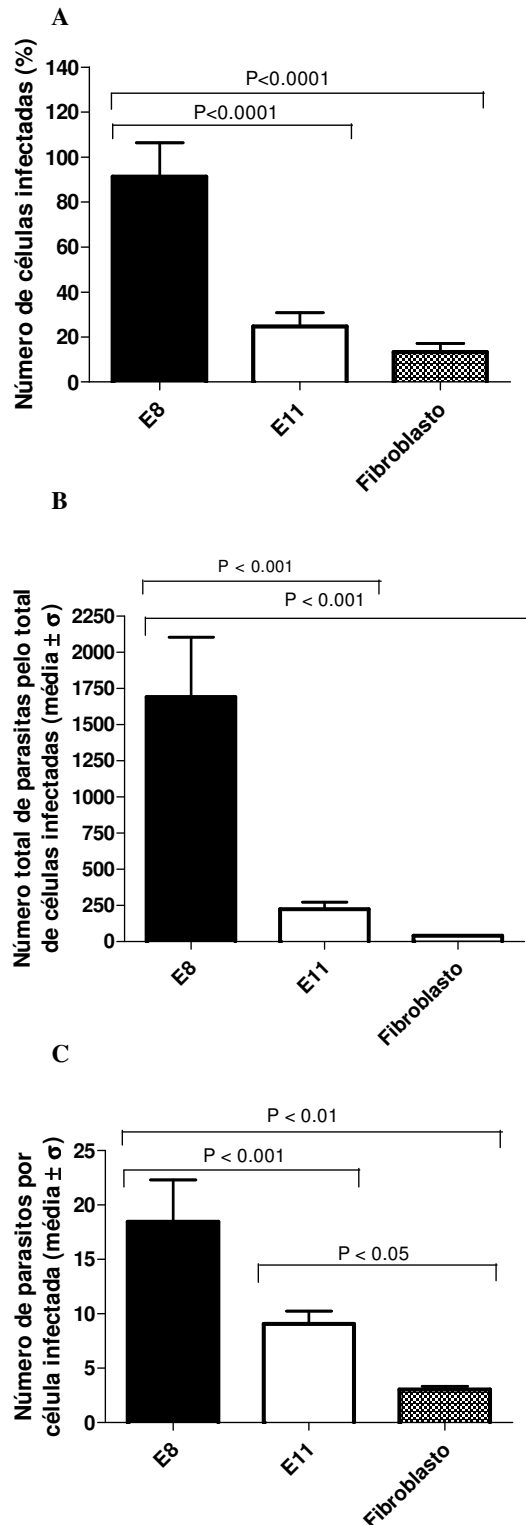
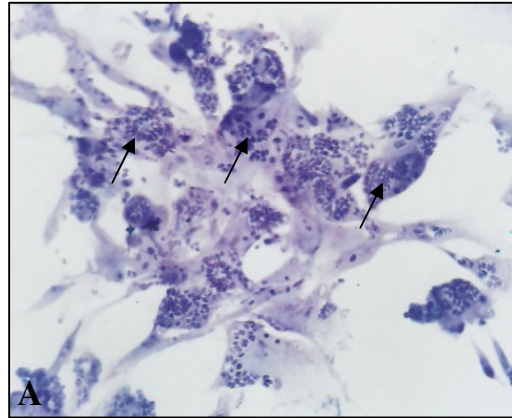
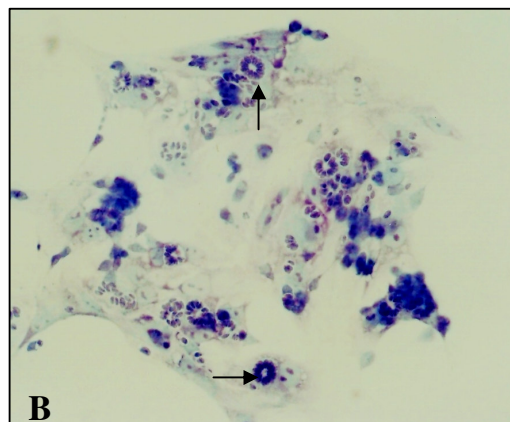


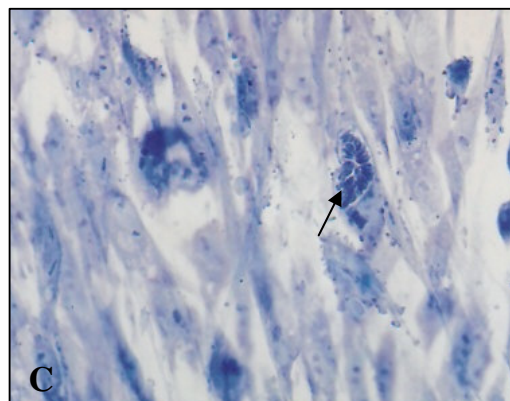
Figura 1. Susceptibilidade das células da retina E8 e E11 à infecção por *T.gondii* comparada a fibroblastos de galinha. **A**, porcentagem de células infectadas, **B**, número total de parasitos pelo total de células infectadas, **C**, número de parasitos por célula infectada. Em E8 houve um aumento significativo em todas as taxas de infecção comparadas aos fibroblastos.



Retina E 8



Retina E 11



Fibroblasto

Figura 2. Susceptibilidade das células da retina (E8 e E11) à infecção por *T. gondii*, comparada à fibroblastos de galinha. **A**, células de retina E8, **B**, células de retina E11, **C**, fibroblastos. Em **E8** houve um aumento significativo em todas as taxas de infecção comparadas aos fibroblastos (setas).

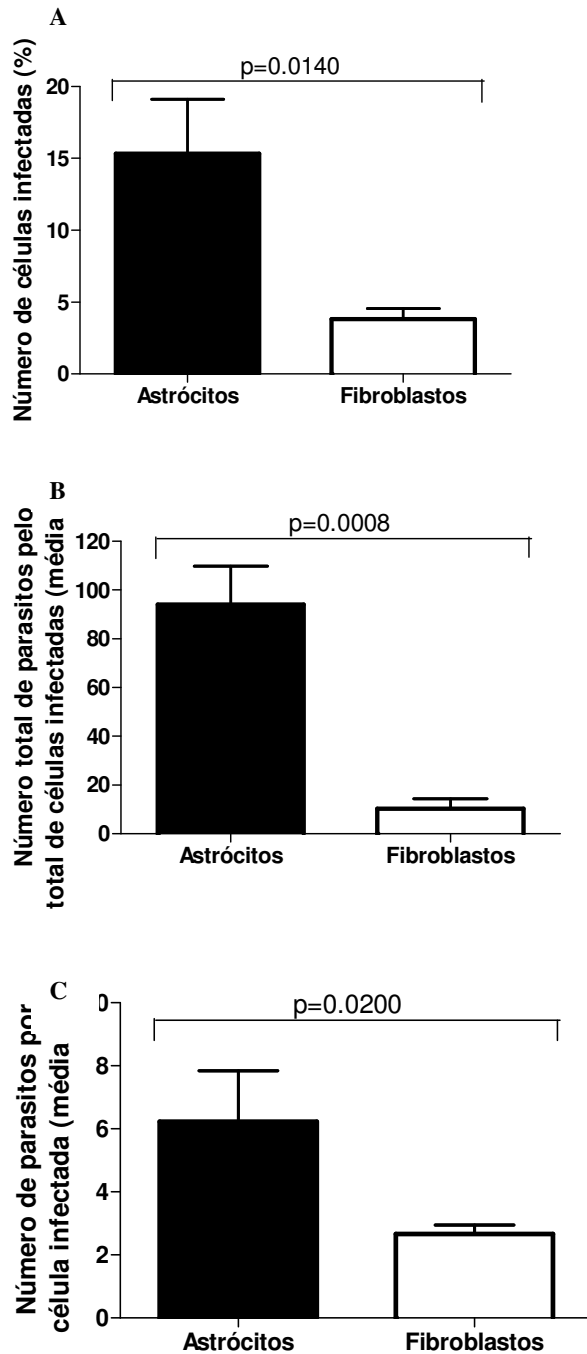


Figura 3. Susceptibilidade de astrócitos humanos à infecção por *T.gondii* comparada a fibroblastos humanos. **A**, porcentagem de células infectadas, **B**, número total de parasitos pelo total de células infectadas, **C**, número de parasitos por célula infectada. Nos astrócitos, houve um aumento significativo em nas taxas de infecção comparadas aos fibroblastos.

4.2. Tratamento com heparina solúvel

Nas células da retina E8 infectadas com taquizoítas de *T. gondii* pré-tratados com heparina solúvel, houve diminuição significativa na porcentagem de células infectadas, no número total de parasitos pelo total de células infectadas e no número médio de parasitos por célula quando comparados com o grupo não tratado (Figura 4, A-C). Pode-se notar a grande quantidade de parasitos fora das células no grupo pré-tratado com heparina (Figura 5, A-B). Por outro lado, nas células da retina E11, não houve diferença significativa nos parâmetros de infecção entre os parasitos tratados ou não com heparina (Figura 4, A-C).

Em relação aos astrócitos humanos submetidos ao tratamento com heparina, houve um significativo aumento em todos os parâmetros de infecção quando comparado ao grupo não tratado (Figura 6 A-C e Figura 7 A e B).

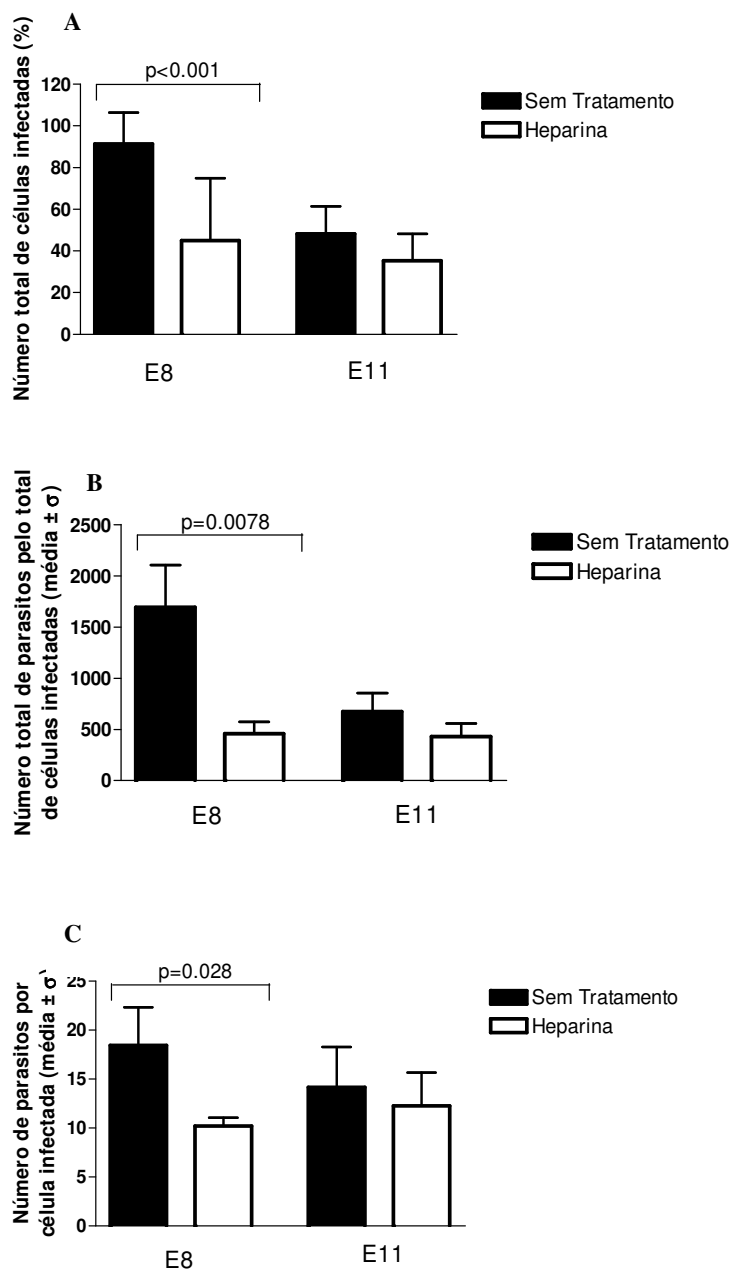
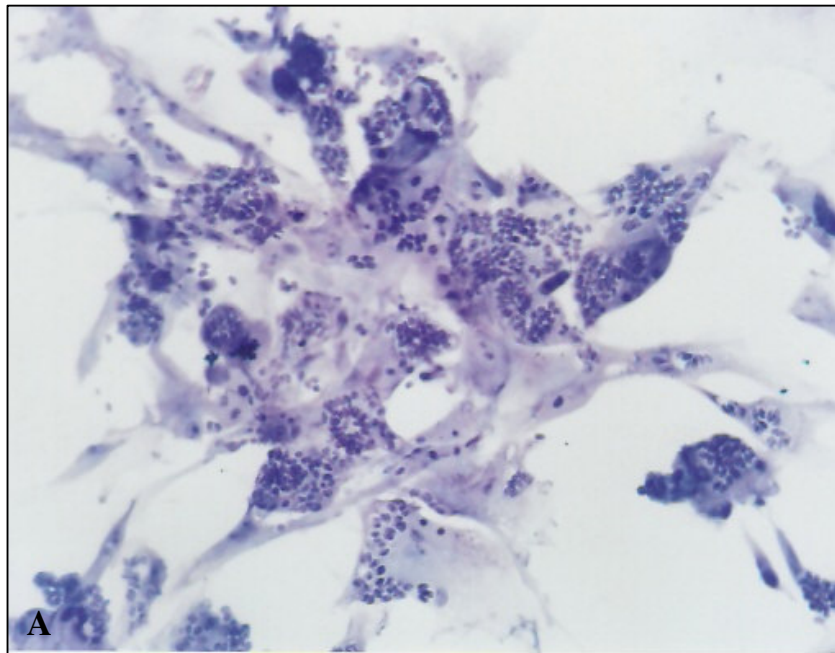
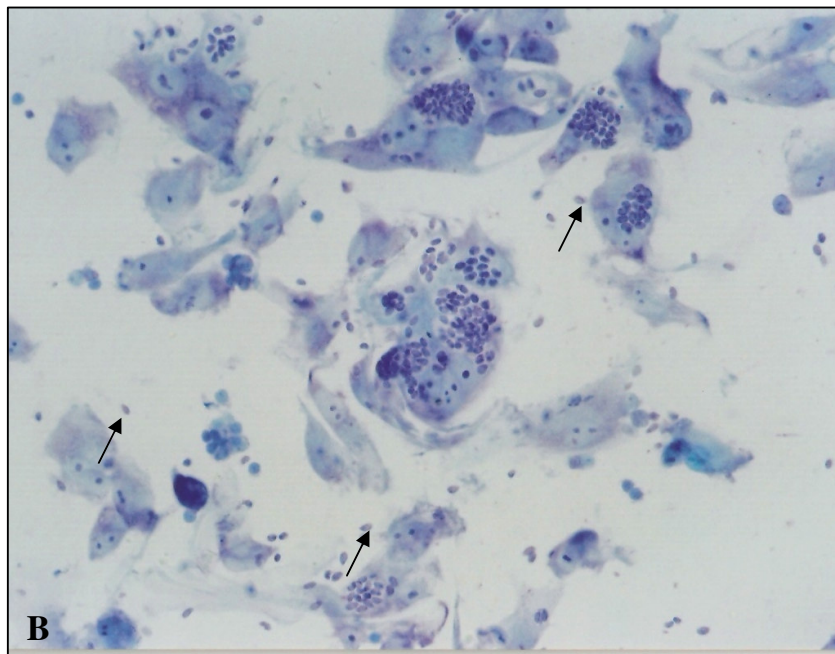


Figura 4. Efeito do pré-tratamento de *T. gondii* com heparina solúvel sobre a infecção de células de embrião de galinha E8 e E11. **A**, porcentagem de células infectadas, **B**, número total de parasitos pelo total de células infectadas, **C**, número de parasitos por célula infectada. Houve uma diminuição significativa nas taxas de infecção das células infectadas com *T. gondii* pré-tratado com heparina comparadas com as células infectadas com o parasito não tratado.



E8 infectadas com *T. gondii* sem tratamento



E8 infectadas com *T. gondii* com tratamento

Figura 5. Efeito do pré-tratamento de *T. gondii* com heparina solúvel sobre a infecção de células de embrião de galinha (E8). **A**, células de retina (E8) sem tratamento e **B**, com heparina. Houve uma diminuição significativa nas taxas de infecção das células infectadas com *T. gondii* pré-tratado com heparina comparadas com as células infectadas com o parasito não tratado. Nota-se em B, a grande quantidade de parasitos fora das células (setas)

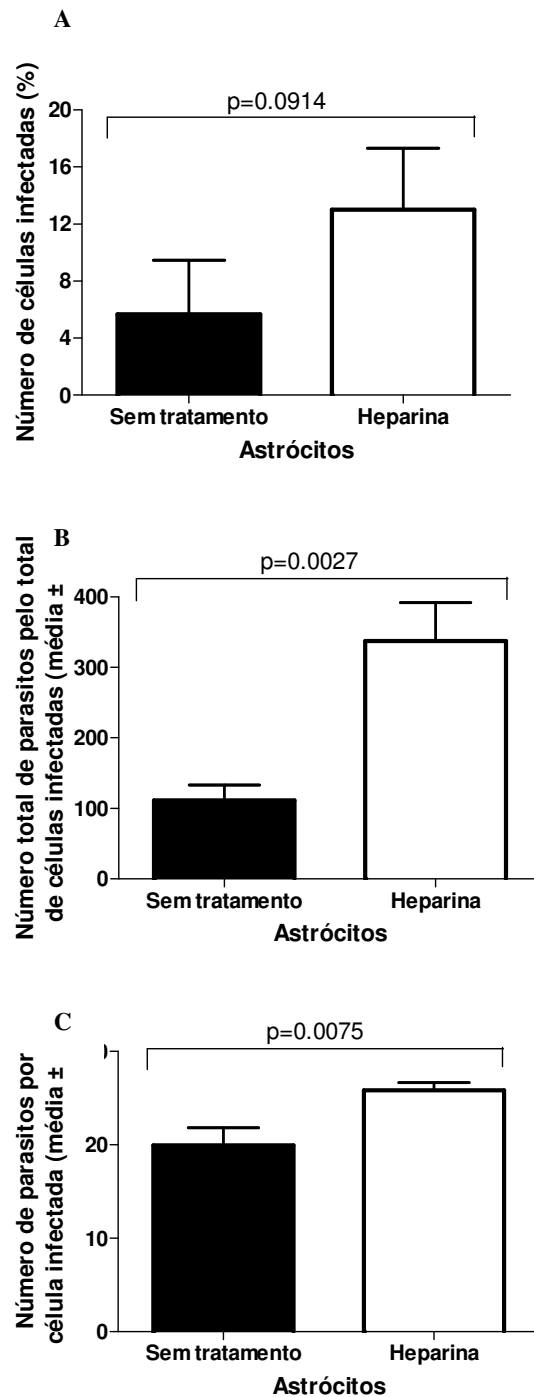


Figura 6. Efeito do pré-tratamento de *T. gondii* com heparina solúvel sobre a infecção de astrócitos humanos. **A**, porcentagem de células infectadas, **B**, número total de parasitos pelo total de células infectadas, **C**, número de parasitos por célula infectada. Houve uma diminuição significativa nas taxas de infecção das células infectadas com *T. gondii* pré-tratado com heparina comparadas com as células infectadas com o parasito não tratado.

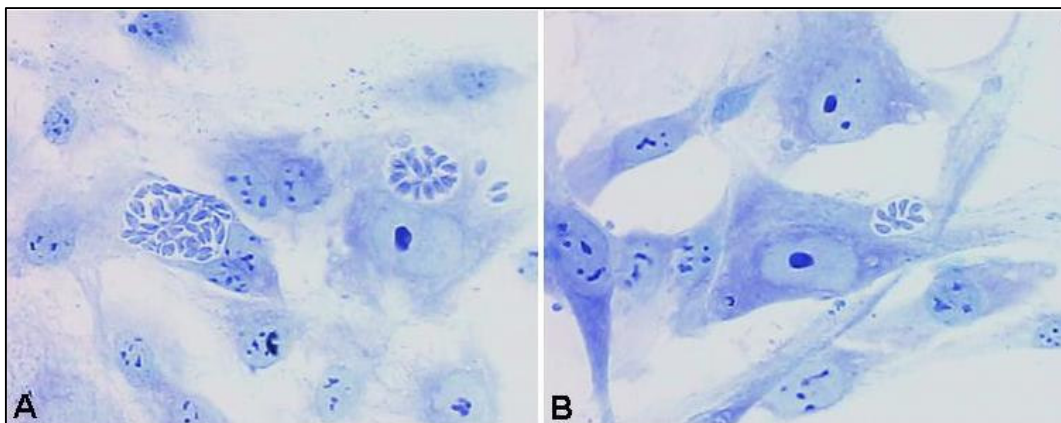


Figura 7. Fotomicrografia de astrócitos humanos infectados com taquizoítas da cepa RH de *T.gondii* tratados e não tratados com heparina solúvel, 360x. Observa-se nas células infectadas com parasitos tratados com heparina (A) um maior número de parasitos por célula comparada com as células infectadas com parasitos não tratados (B) (setas).

4.3.Tratamento com anticorpo monoclonal anti-SAG1

Após 24 horas de infecção com taquizoítas de *T. gondii* previamente tratados com mAb anti-SAG-1, houve significativa redução na porcentagem de células infectadas, no número total de parasitos pelo total de células infectadas e no número médio de parasitas por célula quando comparados com o grupo não tratado (Figura 4 A-C).

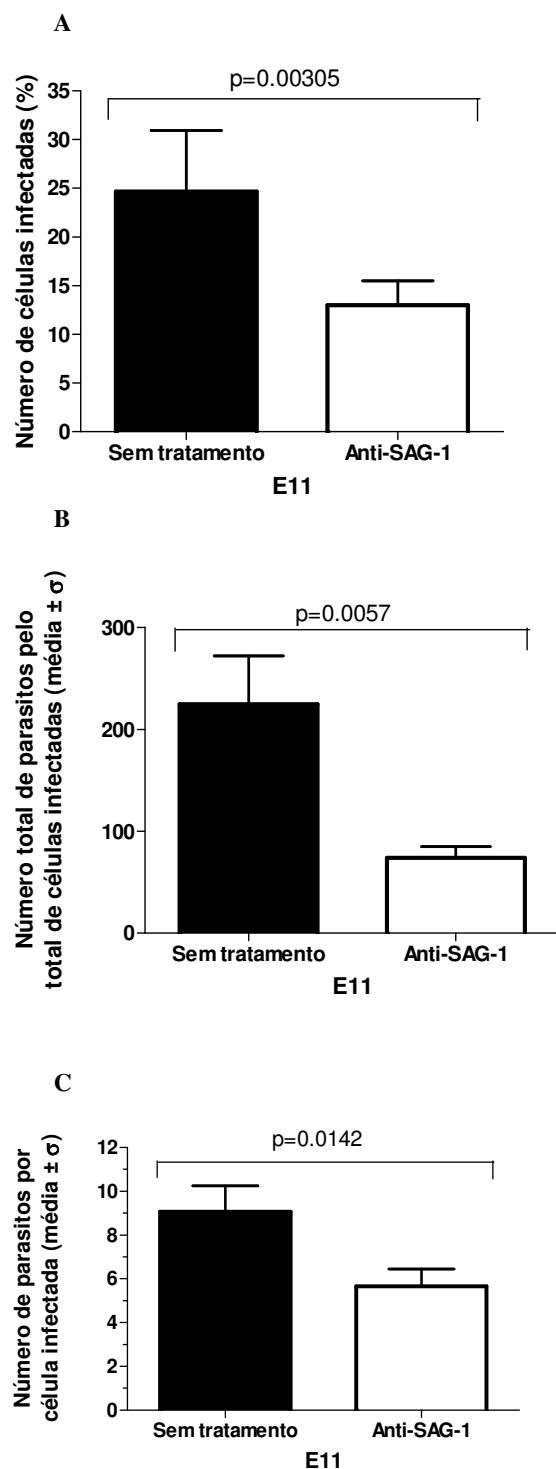


Figura 8. Efeito do pré-tratamento de *T. gondii* com anti-SAG1 sobre a infecção de células de embrião de galinha E11. **A**, porcentagem de células infectadas, **B**, número total de parasitos pelo total de células infectadas, **C**, número de parasitos por célula infectada. Houve uma diminuição significativa nas taxas de infecção das células infectadas com *T. gondii* pré-tratado com anti-SAG1 comparadas com as células infectadas com o parasito não tratado.

4.4. Ensaio de imunofluorescência

No ensaio de imunofluorescência indireta houve maior marcação de heparina nas células da retina de embrião de galinha de 8 e 11 dias quando comparadas com os fibroblastos. A marcação é discreta na maioria dos fibroblastos, com algumas células mais coradas, enquanto que na cultura de retina, a grande maioria das células tem forte marcação (Figura 9 B,E e F).

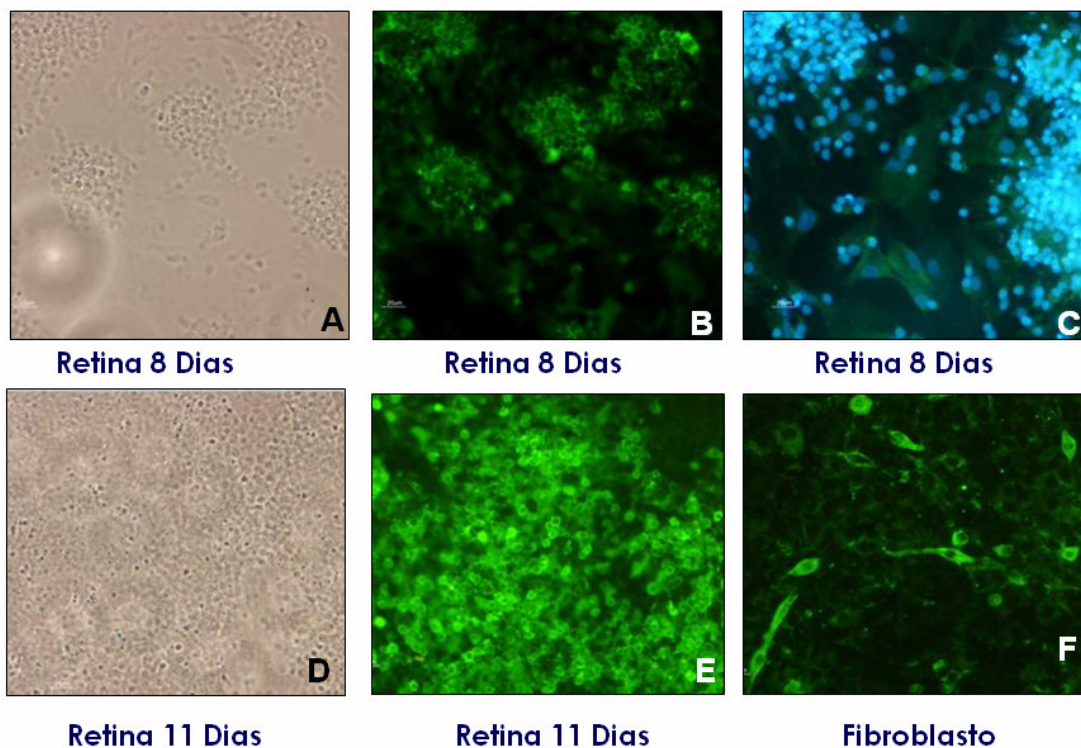


Figura 9. Fotomicrografia de células da retina e fibroblasto de embriões de galinha. A e D, campos B e E, vistos em Nomarski. B, C, E, F, Imunofluorescência utilizando anticorpo monoclonal anti-heparina (ST1). A, B e C, células de E8 e E, células de E11 mostrando intensa marcação. F, fibroblasto mostrando marcação discreta comparados à retina.

4.5.Tratamento com IFN- γ

Após 24 horas de infecção com *T. gondii*, nossos resultados demonstraram que em astrócitos humanos tratados com IFN- γ , houve uma redução significativa somente no número total de parasitas pelo total de células infectadas quando comparados com o grupo não tratado. O mesmo não ocorreu com a porcentagem de células infectadas e o número de parasitas por célula infectada (Figura 7 A-C, Figura 11 A-B).

4.6.Produção de nitritos

O efeito do IFN- γ na produção de nitritos foi analisado pelo método de Griess, conforme descrito em Material e Métodos. Houve produção de nitritos somente nos níveis basais tanto nas células estimuladas com IFN- γ quanto nas células não estimuladas às 24 horas antes da infecção com *T. gondii* e três horas pós-infecção.

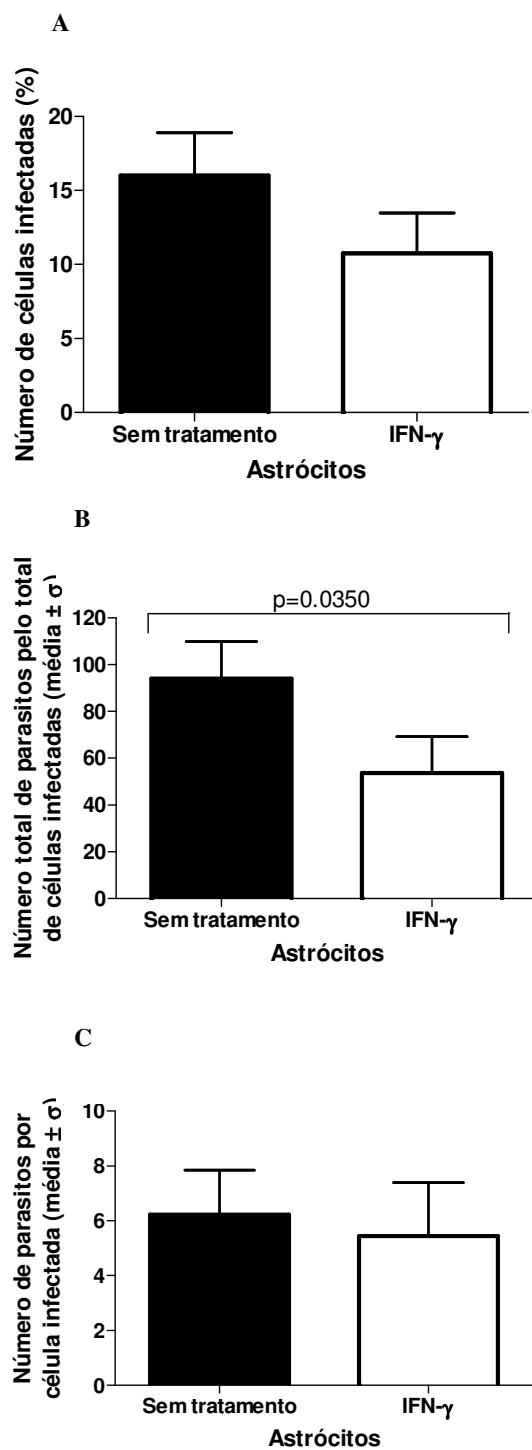


Figura 10. Efeito da estimulação de astrócitos humanos com IFN- γ sobre a invasão de *T. gondii*. **A**, porcentagem de células infectadas, **B**, número total de parasitos pelo total de células infectadas, **C**, número de parasitos por célula infectada. Houve uma diminuição significativa no número total de parasitos pelo total de células infectadas comparadas com as células não estimuladas com IFN- γ (**B**).

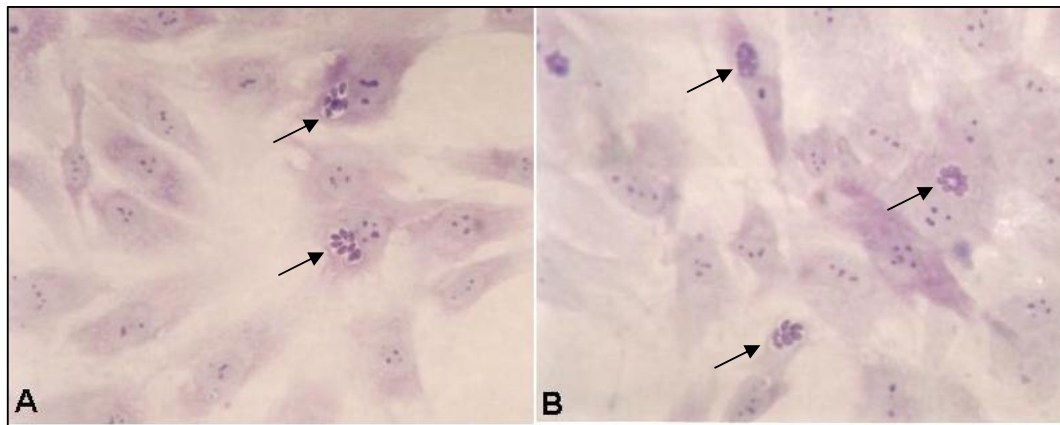


Figura 11. Fotomicrografia de astrócitos humanos estimulados com IFN- γ e somente com meio de cultura e infectados com taquizoítas da cepa RH de *T.gondii*, 145x. Observa-se nas células estimuladas IFN- γ (A) uma diminuição no número total de parasitos pelo total de células infectadas comparadas com os astrócitos não tratados (B) (setas).

5. DISCUSSÃO

Células de diferentes regiões cerebrais são diferentemente susceptíveis à infecção por *T. gondii*, dependendo do estágio de desenvolvimento do tecido (por exemplo, fetal *versus* neonatal) (LUDER et al., 1999). Considerando que mudanças substanciais no microambiente cerebral ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e que a retinocoroidite congênita e adquirida estão associadas com os estágios de desenvolvimento de indivíduos infectados, características metabólicas da retina embrionária podem ser relevantes à susceptibilidade deste tecido à toxoplasmose. No presente estudo, modelos de retina embrionária de galinha de 8 e 11 dias de idade, mostraram que a eficiente infecção e proliferação de *T. gondii* foram dependentes do estágio embrionário do tecido. A específica expressão temporal de heparina nas células progenitoras de linhagens de células da glia durante o desenvolvimento do SNC, sugere que a heparina possa ter um papel fundamental nesta linhagem de células e nos neurônios subjacentes (STRINGER et al., 1999).

A redução parcial da proliferação de taquizoítas em culturas de retina de embrião de galinha de diferentes idades tratadas previamente com inibidores da síntese de putrescina, sugere que *T. gondii* requer poliaminas do tecido infectado para o seu crescimento (MORAES et al., 2004).

De acordo com estudos de Smith e colaboradores (2004), a maior susceptibilidade do endotélio vascular retiniano à infecção por taquizoítas de *T. gondii*, pode ser explicado em parte pela localização preferencial do *T. gondii* na retina. Susceptibilidade pode estar relacionada com a ligação preferencial de taquizoítas à superfície endotelial vascular retiniana, relativa facilidade de penetrar na célula, taxa de replicação intracelular ou ainda modulação diferencial da resposta celular à infecção.

Proteoglicanos sulfatados são uma classe de receptores usados para a invasão à célula hospedeira pelo *Toxoplasma*, e a distribuição generalizada dessas moléculas na superfície celular pode contribuir para a ampla especificidade das células hospedeiras susceptíveis à invasão por esse parasito. Cadeias de heparan sulfato (HS) sofrem modificações no complexo de Golgi pela adição de grupos sulfatos em vários pontos da cadeia e a reação inicial envolve N-deacetilação e N-sulfatação pelas enzimas NDST (ESKO, LINDAHL, 2001). Quatro isoformas de NDST tem sido identificadas em vertebrados e mutação nos genes de algumas isoformas provocam profundos efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário, demonstrando o papel essencial da sulfatação de HS. NDTS1 e NDTS2 diferem drasticamente de NDTS3 e NDTS4 na atividade e no padrão de expressão. NDST1 e NDST2 são de expressão ubíqua, enquanto NDST3 e NDST4 são expressas somente durante o desenvolvimento embrionário e em cérebro adulto (AIKAWA; ESKO, 1999; AIKAWA et al, 2001). Pesquisas recentes demonstraram que para invasão em células ovarianas de hamster Chinês, *T. gondii* requer N-sulfatação de heparan sulfato iniciado pela NDST1 (BISHOP et al., 2005).

No presente estudo, houve uma menor infecção por *T. gondii* nas células de retina de embrião de galinha de 8 dias infectadas com parasitos pré-tratados com heparina quando comparadas com as células não tratadas (Figura 5 e Figura 9 A-B). Esses resultados juntamente com os do teste de imunofluorescência, onde houve uma maior marcação de heparina nas células E8 e E11 quando comparadas com fibroblastos de embrião de galinha (Figura 8 B,E,H) sugerem que uma distribuição diferencial de heparina na superfície das células de retina pode facilitar a invasão por *T. gondii*. A inibição da invasão parasitária por glicosaminoglicanas foi também observada por Carruthers e colaboradores (2001) com a utilização de heparina, heparan sulfato e sulfato de condroitina, indicando que

receptores ligantes do parasito são capazes de reconhecer uma grande variedade de GAGs na superfície da célula hospedeira.

No presente estudo, ao contrário das células de retina de embrião de galinha, pré-tratamento com heparina aumentou significativamente as taxas de replicação do *T. gondii* em astrócitos humanos quando comparados aos fibroblastos. Esses dados estão de acordo com os encontrados por Bishop e colaboradores (2005), onde demonstraram que tratamentos com heparina exógena e anticorpo anti-heparan sulfato não bloquearam a invasão do *T. gondii* em células ovarianas de hamster Chinês. Esses resultados sugerem que a heparina/ heparan sulfato pode agir como co-receptor na infecção por *T. gondii*, no qual a interação inicial com heparan sulfato facilita uma segunda interação com um receptor protéico ou lipídico. Foi observado que herpes virus simplex interage com heparan sulfato via glicoproteína C, seguido pela ligação de um ou mais receptores Hve (SHUKLA; SPEAR, 2001). Em trabalho recente, foi analisado como a estrutura do heparan sulfato afeta a infecção de *T. gondii* em cultura de várias linhagens celulares mutantes na biosíntese de heparan sulfato (BISHOP; ESKO, 2005). Em contraste com outros estudos, os autores demonstraram que o papel do heparan sulfato na infecção pode não estar relacionado com a invasão do parasita e sim com sua replicação no vacúolo parasitóforo (BISHOP; et al., 2005). Neste caso, provavelmente o heparan sulfato não aparece como um receptor para *T. gondii* mas sim como facilitador da replicação do parasita pós-invasão (BISHOP; ESKO, 2005), sugerindo que o parasito se ligue e leve o heparan sulfato contido na superfície para dentro da célula facilitando a replicação intracelular.

Estudos adicionais devem ser realizados para diferenciação da atividade e padrão de expressão das quatro isoformas de NDST nas células de retina de galinha e humanos.

Astrócitos humanos são as células hospedeiras predominantes para o *T. gondii* no SNC e suportam bem o crescimento de estágios taquizoítas (HALONEN et al., 1996). IFN- γ tem sido demonstrado inibindo a replicação do parasito em astrócitos por mecanismo independente da produção de NO e privação de triptofano (HALONEN et al., 1998). No presente trabalho, nossos resultados demonstraram que em astrócitos humanos tratados com IFN- γ houve redução somente no número total de parasitas pelo total de células infectadas quando comparados com o grupo não tratado. Além disso, observou-se ainda que a produção de NO permaneceu em níveis basais tanto nas células estimuladas com IFN- γ , quanto nas células não estimuladas. Esses resultados sugerem que a redução da invasão e replicação de *T. gondii* por IFN- γ em astrócitos humanos provavelmente seja independente de mecanismos envolvendo a produção de NO. Além disso, outra hipótese pode ser sustentada, na qual a presença de heparina em quantidades variáveis nessas células pode exercer um efeito inibitório da ação do IFN- γ no controle do parasitismo. Acredita-se que o IFN- γ pode ligar-se à heparina com alta afinidade em alguns tipos celulares. Daubener e colaboradores, mostraram que heparina/heparan sulfato são hábeis para inibir a resposta ao IFN- γ em células de glioblastoma e fibroblastos humanos em frações dose dependente.

6. CONCLUSÕES

- Células de retina de embrião de galinha de oito dias de idade são mais susceptíveis à infecção por taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* que fibroblastos, possivelmente pela distribuição diferencial de moléculas de heparina na superfície dessas células, facilitando a adesão/invasão pelo parasito.

- A redução da invasão de *T. gondii* em astrócitos humanos estimulados com IFN- γ provavelmente seja independente de mecanismos envolvendo a produção de óxido nítrico.

- O diferente efeito do pré-tratamento de *T. gondii* com heparina sobre a invasão e replicação do parasito em células embrionárias de galinha e astrócitos da cabeça do nervo óptico humano, sugere que a influência da heparina seja modulada pelo tipo celular e isso possa por sua vez influenciar na gravidade da doença em alguns órgãos, como os olhos, quando comparados a outros tecidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA J, ESKO, J D. Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/ N-sulfotransferase family. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 274, n. 5, p. 2690-2695, 1999.

AIKAWA J, GROBE K, TSUJIMOTO M, ESKO JD. Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 5876-5882, 2001.

ALEXANDER DL, MITAL J, WARD GE, BRADLEY P, BOOTHROYD JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **Plos Pathogens**, v. 1, p. 137-148, 2005.

BAI X, ESKO JD. An animal cell mutant defective in heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17711-17717, 1996.

BISHOP JR, CRAWFORD BE, ESKO JD. Cell surface heparan sulfate promotes replication of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 5395-401, 2005.

BISHOP JR, ESKO JD. The elusive role of heparan sulfate in *Toxoplasma gondii* infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 139, p. 267-269, 2005.

BOEHM U, KLAMP T, GROOT M, HOWARD JC. Cellular responses to interferon-gamma. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 749-795, 1997.

BOOTHROYD JC, GRIGG ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 438-442, 2002.

CARME B, BISSUEL F, AJZENBERG D, BOUYNE R, AZNAR C, DEMAR M, BICHAT S, LOUVEL D, BOURBIGOT AM, PENEAU C, NERON P, DARDE ML. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4037-4044, 2002.

CARRUTHERS VB. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. **Parasitology international**, v.48, p1-10, 1999.

CARRUTHERS VB, BOOTHROYD JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 83-9, 2007.

CARRUTHERS VB, HAKANSSON S, GIDDINGS OK, SIBLEY LD. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. **Infection and Immunity**, v. 68, p 4005-4011, 2000.

CARRUTHERS VB, SIBLEY LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **Europ J Cell Bio** v. 73, p. 114-123, 1997.

CEREDE O, DUBREMETZ JF, SOETE M, DESLEE D, VIAL H, BOUT D, LEBRUN M. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. **J. Exp. Med.**, v.201, p. 453-463.

CREUZET C, ROBERT F, ROISIN MP, TAN HV, BENES C, CAMET-DUPOUY J, FAGARD R. Neurons in primary culture are less efficiently infected by *Toxoplasma gondii* than glial cells. **Parasitol. Res.**, v. 84, p. 25-30, 1998.

CHAO CC, HU S, GEKKER G, NOVICK WJ, JR., REMINGTON JS, PETERSON PK. Effects of cytokines on multiplication of *Toxoplasma gondii* in microglial cells. **The Journal of Immunology**, v. 150, p. 3404-3410, 1993.

CHAO CC, HU S, PETERSON PK. Glia, cytokines, and neurotoxicity. **Critical Reviews Neurobiology**, v. 9, p.189-205, 1995.

CHARLES E, CALLEGAN MC, BLADER IJ. The SAG1 *Toxoplasma* Surface Protein is Not Required for Acute Ocular Toxoplasmosis in Mice. **Infection and Immunity**, 2007.

CRISANTI P, PESSAC B, CALOTHY G. Avian neuroretina cells in oncogene studies. **Methods in Enzymology**, v. 254, p. 77-97, 1995.

DAUBENER W, NOCKEMANN S, GUTSCHE M, HADDING U. Heparin inhibits the antiparasitic and immune modulatory effects of human recombinant interferon-gamma. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 688-692, 1995.

DE MELLO FG, BACHRACH, NIRENBERG M. Ornithine and glutamic acid decarboxylase activities in the developing chick retina. **J. Neurochem.**, v. 27, p. 847-851, 1976.

DENKERS E Y, GAZZINELLI R T. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, p. 569-588, 1998.

ESKO JD, SELLECK SB. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. **Annu. Rev. Biochem.** v. 71, p. 435-471, 2002.

FAGARD R, TAN HV, CREUZET C, PELLOUX H. Differential development of *Toxoplasma gondii* in neural cells. **Parasitology today**, v.15, p. 504-507, 1999.

FERGUSON TA, GRIFFITH TS. A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. **Immunological Reviews**, v. 213, p. 228-238, 2006.

FERGUSON DJ; HUTCHINSON WM. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of cronicly infected mice. **Virchows Arch. A Pathol Anat Histopathol**, v. 411, p. 39-43, 1987.

FISCHER HG, NITZGEN B, REICHMANN G, GROSS U, HADDING U. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. **Parasitology Research**, v. 83, n. 7, p. 637-641, 1997.

GAGNE SS. Toxoplasmosis. **Primary Care Update Ob Gyns**, v. 8, n. 3, p. 122-126, 2001.

GAZZINELLI RT, BREZIN A, LI Q, NUSSENBLATT RB, CHAN CC. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma. **Experimental Parasitology**, v. 78, p. 217-229, 1994.

GAZZINELLI RT, HAKIM FT, HIENY S, SHEARER GM, SHER A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 146, p. 286-292, 1991.

GIOVANNONI G, HEALES SJ, LAND JM, THOMPSON EJ. The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 4, p. 212-216, 1998.

GLASNER PD, SILVEIRA C, KRUSZON-MORAN D, MARTINS MC, BURNIER JUNIOR M, SILVEIRA S, CAMARGO ME, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, p. 136-144, 1992.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GRIGG ME, BOULEY DM, BUZONI-GATEL D, RACHINEL N, KASPER LH, BOOTHROYD JC. Acute virulence in *Toxoplasma* infection is critically dependent on the immune response to SAG1. **Molecular Microbiology**. (submitted).

GRIGG ME, GANATRA J, BOOTHROYD JC, MARGOLIS TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 5, p. 633-639. 2001.

GROBE, K., J. LEDIN, RINGVALL M, HOLMBORN K, FORSBERG E, ESKO JD, KJELLEN L. Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1573, n. 3, p. 209-215, 2002.

HALONEN SK, CHIU F, WEISS LM. Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4989-4993, 1998.

HALONEN SK, LYMAN WD, CHIU FC. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 55, p. 1150-1156, 1996.

HALONEN SK, TAYLOR GA, WEISS LM. Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5573-5576, 2001.

HALONEN SK, WEISS LM. Investigation into the mechanism of gamma interferon-mediated inhibition of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. **Infection Immunity**, v. 68, p. 3426-3430, 2000.

HENDERLY D E, GENSTLER AJ, SMITH R., RAO NA. Changing patterns of uveitis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 103, p. 131–136, 1987.

HOLLAND GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, p. 973-88, 2003.

HOWE DK, SIBLEY LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infections Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.

HUNTER CA, REMINGTON JS. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. **The Journal of Infections Diseases**, v.170, p. 1057-67, 1994.

HUYNH MH, OPITZ C, KWOK LY, TOMLEY FM, CARRUTHERS VB, SOLDATI D. Trans-genera reconstitution and complementation of an adhesion complex in *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 771-782, 2004.

HUYNH MH, RABENAU KE, HARPER JM, BEATTY WL, SIBLEY LD, CARRUTHERS VB. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. **The Embo Journal**, v. 22, n. 9, p. 2082-2090, 2003.

ISRAELSKI DM, REMINGTON JS. 1993. Toxoplasmosis in non-AIDS immunocompromised host. **Curr. Opin. Top. Infect. Dis.**, v.13, p. 322-356, 1993.

JACQUET, A.; COULON, L.; DE NÈVE, J.; DAMINET, V.; HAUMONT, M.; GARCIA, L.; BOLLEN ,A.; JURADO, M.; BIEMANS R. The surface antigen SAG-3 mediates the

attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. **Mol. Bioch. Parasitol**, v. 116, p. 35-44, 2001.

JONES JL, LOPES A, WILSON M, SCHULKIN J, GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet. Gynecol. Surv.*, v.56, n.5, p.296-305, 2001.

JONES JL, MUCCIOLI C, BELFORT R, JR., HOLLAND GN, ROBERTS JM, SILVEIRA C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 12, n. 4, p. 582-587, 2006.

JONES TC, BIENZ KA, ERB P. In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. **Infection Immunity**, v. 51, p. 147-156, 1986.

JUNG C, LEE CY, GRIGG ME. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 285-296, 2004.

KANG H, SUZUKI Y. Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. **Infection Immunity**, v. 69, p. 2920-2927, 2001.

KEELEY A, SOLDATI D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n° 10, p. 528-532, 2004.

KHAN A, JORDAN C, MUCCIOLI C, VALLOCHI AL, RIZZO LV, BELFORT R, JR., VITOR RW, SILVEIRA C, SIBLEY LD. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 12, n. 6, p. 942-959, 2006.

KOBAYASHI S, VIDAL I, PENA JD, HERNANDEZ MR. Expression of neuronal cell adhesion molecule (NCAM) characterizes a subpopulation of type 1 astrocytes in human optic nerve head. **Glia**, v. 20, p. 262-273, 1997.

KOPPE, J.G.; LOWER-SIEGER, D.H.; ROEVER-BONNET, H. Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. **Lancet**, p. 254-256, 1986.

LEKUTIS C, FERGUSON DJ, GRIGG ME, CAMPS M, BOOTHROYD JC. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1285-1292, 2001.

LUDER CG, GIRALDO-VELASQUEZ M, SENDTNER M, GROSS U. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. **Experimental Parasitology**, v. 93, p. 23-32, 1999.

LUFT B J, REMINGTON, J S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infections Diseases**, v. 15, p. 211-222, 1992.

MINEO JR, KASPER LH. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 11-20, 1994.

MINEO JR, MCLEOD R, MACK D, SMITH J, KHAN IA, ELY KH, KASPER LH. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **The Journal of Immunology**, v. 150, p. 3951-3964, 1993.

MONTOYA JG, LIESENFELD O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MORAES AM, PESSOA CN, VOMMARO RC, DE SOUZA W, DE MELLO FG, HOKOC JN. Cultured embryonic retina systems as a model for the study of underlying mechanisms of *Toxoplasma gondii* infection. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, p. 2813-2821, 2004.

NICHOLSON DH, WOLCHOK EB. Ocular toxoplasmosis in an adult receiving long-term corticosteroid therapy. **Archives of Ophthalmology**, v. 94, n. 2, p. 248-254, 1976.

OLIANI SM, FREYMULLER E, TAKAHASHI HK, STRAUS AH. Immunocytochemical localization of heparin in secretory granules of rat peritoneal mast cells using a monoclonal anti-heparin antibody (ST-1). **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 45, p. 231-235, 1997.

OLIVEIRA JG, SILVA NM, SANTOS AAD, SOUZA MA, FERREIRA GLS, MINEO JR, FERRO EAV. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN- γ . **Placenta**, v. 27, n 6-7, p. 691-698, 2006.

ORTEGA-BARRIA, E. BOOTHROYD J. C. A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 274, n. 3, p. 1267-1276, 1999.

PERKINS ES. Ocular toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 57, p. 1-17, 1973.

REY L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2nd ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 410p. 2002.

ROBERTS F, MCLEOD R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. **Parasitology Today**, v. 15, n. 2, p. 51-57, 1999.

ROZENFELD C, MARTINEZ R, FIGUEIREDO RT, BOZZA MT, LIMA FRS, PIRES AL, SILVA PM et al. Soluble factors released by *Toxoplasma gondii* infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration. **American Society for Microbiology**, v.71, n° 4, p.2047-2057, 2003.

SCHERRER J, ILIEV ME, HALBERSTADT M, KODJIKIAN L, GARWEG JG. Visual function in human ocular toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 91, p. 233-236, 2007.

SCHLUTER D, DECKERT M, HOF H, FREI K. *Toxoplasma gondii* infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but gamma interferon- and tumor necrosis factor-stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of *T. gondii*. **Infection Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7889-7893, 2001.

SHUKLA D, SPEAR PG. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 503-510, 2001.

SIBLEY LD, HAKANSSON S, CARRUTHERS VB. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. **Current Biology**, v. 8, p. R12-14, 1998.

SILVEIRA C, BELFORT R, JR., MUCCIOLI C, ABREU MT, MARTINS MC, VICTORA C, NUSSENBLATT RB, HOLLAND GN. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 131, n. 3, p. 351-354, 2001.

SMITH JR, FRANC DT, CARTER NS, ZAMORA D, PLANCK SR, ROSENBAUM JT. Susceptibility of retinal vascular endothelium to infection with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, p. 1157-1161, 2004.

SOLDATI D, DUBREMETZ JF, LEBRUN M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1293-1302, 2001.

STOLL G, JANDER S, SCHROETER M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. **Journal of Neural Transmission Supplementum**, v. 59, p. 81-9, 2000.

STRINGER SE, MAYER-PROSCHEL M, KALYANI A, RAO M, GALLAGHER JT. Heparin is a unique marker of progenitors in the glial cell lineage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 25455-25460, 1999.

TAYLOR GA, JEFFERS M, LARGAESPADA DA, JENKINS NA, COPELAND NG, WOUDE GF. Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 34, p. 20399-20405, 1996.

WERK R. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? **Reviews of Infections Diseases**, v. 7, p. 449-457, 1985.

YANAGISHITA M, HASCALL VC. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 9451-9454, 1992.

YAP GS, SHER A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent

host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 1083-1092, 1999.

VALLOCHI AL, MUCCIOLI C, MARTINS MC, SILVEIRA C, BELFORT R, JR., RIZZO LV. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, p. 39:350-351, 2005.

VALLOCHI AL, DA SILVA RIOS L, NAKAMURA MV, SILVEIRA C, MUCCIOLI C, MARTINS MC, BELFORT R, JR., RIZZO LV. The involvement of autoimmunity against retinal antigens in determining disease severity in toxoplasmosis. **Journal of Autoimmunity**, v.24, p. 25-32, 2005.