

INFLUÊNCIA DA HEPARINA NA INVASÃO DE ASTRÓCITOS HUMANOS

POR *Toxoplasma gondii*

ÚRSULA COUTINHO ANTUNES¹; CRISTIANO GONÇALVES PEREIRA¹;
ALEXANDRE LUIZ NEVES SILVA¹; ENEIDA CÉSAR MASTRANTONIO¹

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 astrócitos da cabeça do nervo óptico humano foram mantidas em lamínulas durante aproximadamente uma semana, quando foram infectadas com taquizoítas de *Toxoplasma gondii* por 24 horas. Parasitos foram pré-tratados com heparina solúvel, enquanto astrócitos humanos foram estimulados com interferon gama (IFN- γ) antes e após a infecção. As taxas de infecção como; número de células infectadas, número de parasitos por células infectadas (taxa de replicação intracelular) e número total de parasitos pelo número total de células infectadas, foram determinadas pela contagem de, no mínimo 100 células por condição experimental. Pré-tratamento com heparina aumentou significativamente as taxas de infecção e replicação intracelular do parasito nos astrócitos humanos, e, os astrócitos estimulados com IFN- γ mostraram diminuição significativa em todas as taxas de infecção quando comparados com as células não tratadas. Estes resultados sugerem que a heparina facilita a replicação intracelular em astrócitos humanos e que o IFN- γ realiza um papel fundamental na inibição de *Toxoplasma gondii* nestas células.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, astrócitos, heparina, IFN- γ

ABSTRACT

The purpose of this work was to analyze, *in vitro* model, the influence of the heparin on the susceptibility of retinal cells to infection by *Toxoplasma gondii*. Primary cultures of astrocytes from human optic nerve heads were maintained in coverslips for one week, when were infected with *Toxoplasma gondii* tachyzoites for 24 hours. Parasites were pre-treated with heparin and the astrocytes were stimulated with interferon gamma (IFN- γ) before and after infection. As infection rates; number of infected cells, number of parasites in infected cells (intracellular replication rate) and total number of parasites by the total number of

¹Laboratório de Imunologia Ocular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará 1720, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, cep 38400-902, e-mail: enemastrantonio@yahoo.com.br

infected cells were determined by counting of at least 100 cells per experimental condition. Pre-treatment with heparin increased significantly the rates of infection and intracellular replication of the parasite in human astrocytes, and the astrocytes stimulated with IFN- γ showed significant reduction in all rates of infection when compared with untreated cells. The infection rates; number of the infected cells, number of parasites per infected cell (intracellular replication rate) and total number of parasites for the total number of infected cells were determined by counting at least 100 cells in each experimental condition. These results suggested that heparin facilitates intracellular replication in astrocytes from human and IFN- γ performs fundamental role for inhibition of *Toxoplasma gondii* in these cells.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, astrocytes, heparin, IFN- γ

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa e subclasse Coccidia, comumente encontrados tanto no homem quanto em animais (REY, 2002). Os representantes deste filo possuem compartimentos secretórios especializados na invasão e adesão do parasito à célula hospedeira, conhecidos como grânulos densos (GD), micronemas e roptrias (CARRUTHERS et al., 2000). Estima-se que aproximadamente em torno de 500 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo (DENKERS; GAZZINELLI, 1998).

A transmissão da toxoplasmose em humanos inicia-se com a 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; LIESENFELD, 2004). Porém, pode ser transmitida também via transplacentária, ou através de órgãos transplantados e acidentes laboratoriais (JONES et al., 2001). 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 (GLASNER et al. 1992).

Toxoplasma gondii apresenta três formas infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. As formas taquizoítas se multiplicam rapidamente dentro de um vacúolo parasitóforo nas células infectadas e 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. (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). A forma bradizoíta se caracteriza por apresentar multiplicação lenta e 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). Entretanto, a toxoplasmose é uma patologia importante em pacientes imunocomprometidos e em fetos, sendo que a toxoplasmose congênita origina a maioria dos casos de toxoplasmose ocular (PERKINS, 1973). O primeiro alvo da toxoplasmose ocular é a retina neural, onde o parasito causa inflamação necrotizante, e na fase inativa, forma cistos intracelulares (GAZZINELLI et al, 1994; NICHOLSON; WOLCHOK, 1976). A retina é provavelmente o único tecido humano onde se desenvolve lesão ativa por *Toxoplasma* em indivíduos adultos imunocompetentes, causando sérias conseqüências visuais, inclusive a cegueira (SCHERRER et al., 2007).

A despeito de sua impressionante habilidade para invadir quase todos os tipos de células nucleadas, sabe-se muito pouco sobre receptores do parasito na célula hospedeira que medeiam à invasão do *Toxoplasma gondii*. Devido à baixa seletividade do parasito para células-alvo, é bastante provável que o receptor da célula hospedeira seja comum a diferentes tipos celulares ou que provavelmente existam múltiplos receptores (SIBLEY et al., 1998). Sabe-se que o parasito liga-se à laminina que, por sua vez liga-se a receptores β_1 -integrina da célula hospedeira. Trabalhos sugerem que proteoglicanos sulfatados seriam os principais receptores celulares para *Toxoplasma gondii* (ORTEGA-BARRIA; BOOTHROYD, 1999; SIBLEY et al., 1998).

A secreção de interferon gama (IFN- γ), a principal citocina envolvida no controle do parasitismo, é responsável por estabelecer infecção crônica assintomática por *Toxoplasma 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 óxido nítrico (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).

Uma variedade de cadeias de glicosaminoglicanas (GAGs) sulfatadas podem funcionar como receptores para adesão de *Toxoplasma 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 gondii* através da matriz extracelular (CARRUTHERS et al., 2000).

Um fato interessante quanto à infecção por *Toxoplasma gondii* é o chamado "tropismo" pelo sistema nervoso central. Não se sabe se o *Toxoplasma gondii* penetra essas áreas do SNC facilmente ou se esses sítios imunologicamente privilegiados não erradicam o parasito (SMITH et al., 2004).

A específica expressão temporal de heparina nas células progenitoras de linhagens de células da glia durante o desenvolvimento do SNC, sugerem que a heparina pode ter um papel crítico nesta linhagem de células e nos neurônios subjacentes (STRINGER et al., 1999).

A heparinase é uma enzima induzível, não extracelular produzida por uma bactéria gram negativa, *Flavobacterium heparinum*. Este microorganismo foi originalmente selecionado do solo devido a sua habilidade de usar a heparina como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre (KORN; PAYSA, 1956). Sendo assim, tem-se observado a utilização da heparinase em ensaios experimentais para avaliar o papel da heparina na superfície de células, bem como sua estrutura (LINHARDT et al, 1990).

Este trabalho justifica-se pela necessidade de estudos que estabeleçam os fatores de maior susceptibilidade das células da retina ao *Toxoplasma gondii* ou "tropismo" de *Toxoplasma 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.

O objetivo do presente trabalho foi analisar o papel de moléculas receptoras do hospedeiro, como heparina/heparan sulfato, envolvidos na adesão/invasão do parasito em astrócitos e, analisar a influência do tratamento com Interferon- γ (IFN- γ) sobre as taxas de invasão e replicação de *Toxoplasma gondii* em culturas primárias de astrócitos humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

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 (LEA–UFU). 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 e o sedimento contendo taquizoítas ressuspensas em meio de cultivo celular (Meio Dulbecco MEM (DMEM), Cultilab, Campinas, Brasil) contado em câmara de Neubauer para análise da viabilidade dos parasitos.

2. Cultura de células

2.1. 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 (HC – UFU). Os pólos posteriores dos olhos humanos foram dissecados, e as cabeças dos nervos ópticos removidas, e mantidas em frascos de cultura de 25 cm². As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 20% de SFB, 0,37% de bicarbonato de sódio e antibiótico-antimicótico (KOBAYASHI et al., 1997). Os astrócitos humanos foram dispostos em placas de cultura celular de 24 poços contendo lamínula redonda de vidro para posterior análise microscópica.

3. Tratamento com heparina solúvel

Culturas confluentes de astrócitos humanos foram infectadas com taquizoítas de *Toxoplasma 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., 2000).

4. Tratamento com IFN- γ

Culturas confluentes de astrócitos humanos em lamínulas foram infectadas com taquizoítas de *Toxoplasma gondii* no sexto dia de cultivo na concentração de um parasito por célula por 24 horas. Vinte e quatro horas pré-infecção com *Toxoplasma gondii* e três horas pós-infecção, os astrócitos foram tratados com 100 μ c/ml e 200 μ c/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.

5. Infecção por *Toxoplasma gondii*

A infecção por *Toxoplasma gondii* foi realizada no sexto dia de cultivo celular, em células tratadas e não tratadas com heparina solúvel. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, e a infecção foi realizada na concentração de 1 parasito/célula.

6. Análise Microscópica

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 sobre lâminas com glicerina, e analisadas por microscopia ótica quanto aos seguintes parâmetros: a) Número de células infectadas em 100 células contadas, b) número de parasitos por células infectadas (taxa de replicação intracelular) e, c) número total de parasitos pelo número total de células infectadas. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata e os resultados foram determinados através das duas observações.

7. Análise Estatística

Para análise estatística, o número total de parasitos pelo total de células infectadas e o número de parasitos por célula infectada foram expressos como média e desvio padrão, e as diferenças estatísticas entre as médias foram determinadas através de teste *t* de Student e diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Software v.4 (San Diego, USA).

RESULTADOS

1. Tratamento com heparina solúvel

Em relação aos astrócitos humanos infectados com os parasitos pré-tratados com heparina, houve um aumento significativo na porcentagem de células infectadas, no número de parasitos por célula e no número total de parasitos pelo total de células infectadas quando comparados com as células infectadas com parasitos não-tratados (figura 1 A-C e figura 2 A e B).

2. Tratamento com IFN- γ

Após 24 horas de infecção com *Toxoplasma gondii*, nossos resultados demonstraram que em astrócitos humanos tratados com IFN- γ , houve diminuição significativa na porcentagem de células infectadas, no número de parasitos por célula e no número total de parasitos pelo total de células infectadas quando comparados com o grupo não tratado, não havendo diferença significativa nas duas concentrações de IFN- γ utilizadas (Figura 3 A-C).

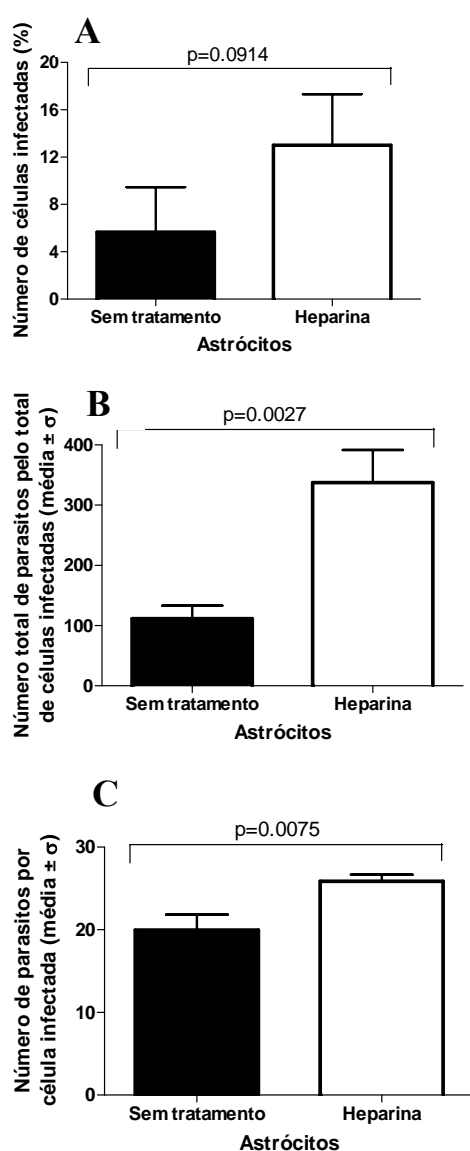


Figura 1. Efeito do pré-tratamento de *Toxoplasma gondii* com heparina solúvel sobre a infecção de astrócitos humanos. **A.** porcentagem de células infectadas; **B.** número de parasitos por célula infectada; **C.** número total de parasitos pelo total de células infectadas.

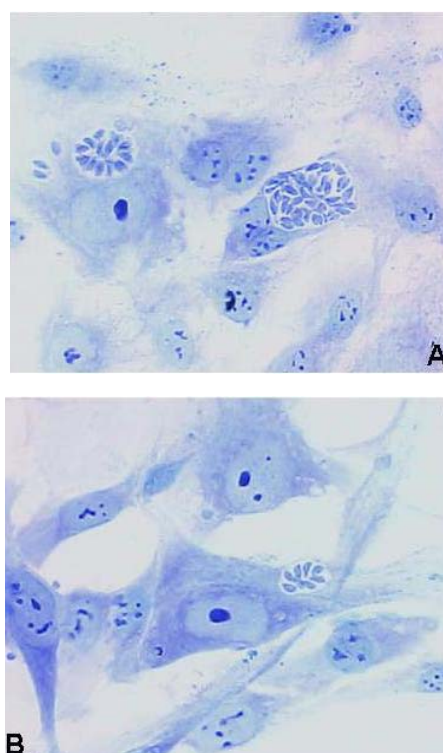


Figura 2. Fotomicrografia de astrócitos humanos infectados com taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii* tratados e não tratados com heparina solúvel. Observa-se nas células infectadas com parasitos tratados com heparina. **(A)** um maior número de parasitos por célula comparada com as células infectadas com parasitos não tratados **(B)** (setas).

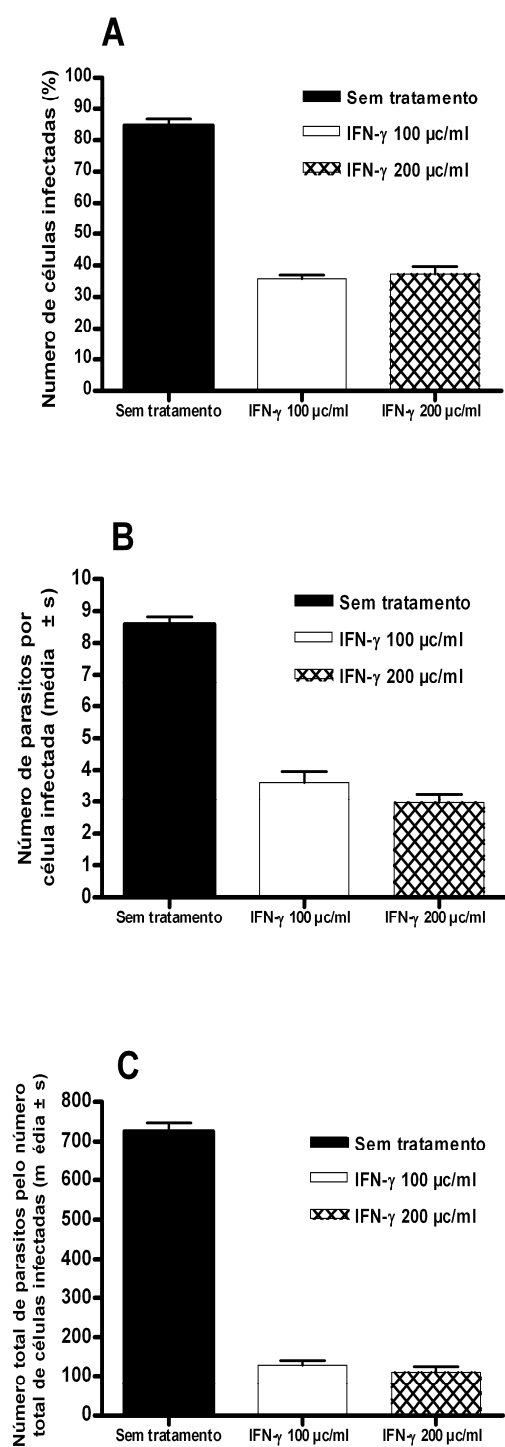


Figura 3. Efeito do tratamento de astrócitos humanos com IFN- γ nas concentrações de 100 e 200 μ c/ml sobre a infecção com *Toxoplasma gondii*. **A**, porcentagem de células infectadas; **B**, número de parasitos por célula infectada; **C**, número total de parasitos pelo total de células infectadas.

DISCUSSÃO

Células de diferentes regiões cerebrais são diferentemente susceptíveis à infecção por *Toxoplasma gondii*, dependendo do estágio de desenvolvimento do tecido (por exemplo, fetal *versus* neonatal) (LUDER et al., 1999). De acordo com estudos de Smith e colaboradores (2004), a maior susceptibilidade do endotélio vascular retiniano à infecção por taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, pode ser explicado em parte pela localização preferencial do *Toxoplasma 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 N-deacetylase/N-sulfotransferase (NDSTs) (ESKO, LINDAHL, 2001). Quatro isoformas de NDSTs 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. NDST1 e NDST2 diferem drasticamente de NDST3 e NDST4 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, *Toxoplasma gondii* requer N-sulfatação de heparan sulfato iniciado pela NDST1 (BISHOP et al., 2005).

No presente estudo, o pré-tratamento com heparina aumentou significativamente as taxas de replicação do *Toxoplasma gondii* em astrócitos humanos. Esses dados estão de acordo com os encontrados por (BISHOP et al., 2005), onde demonstraram que tratamentos com heparina exógena e anticorpo anti-heparan sulfato não bloquearam a invasão do *Toxoplasma gondii* em células ovarianas de hamster Chinês. Esses resultados sugerem que a heparina/ heparan sulfato pode agir como co-receptor na infecção por *Toxoplasma 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 (Hve) 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 *Toxoplasma 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., 2005a). Neste caso, provavelmente o heparan sulfato não aparece como um receptor para *Toxoplasma gondii* mas sim como facilitador da replicação do parasita pós-invasão (BISHOP; ESKO, 2005b), sugerindo que o parasito se ligue e 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 NDSTs nas células de retina de humanos.

Astrócitos humanos são as células hospedeiras predominantes para o *Toxoplasma 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 óxido nítrico e privação de triptofano (HALONEN et al., 1998). No presente trabalho, os resultados demonstraram que em astrócitos humanos tratados com IFN- γ 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. Esses resultados sugerem que o IFN- γ realiza um papel fundamental na redução da invasão e replicação de *Toxoplasma gondii* em astrócitos humanos.

CONCLUSÃO

Os dados do presente trabalho sugerem que a heparina facilitou a invasão e a replicação intracelular em astrócitos humanos e que o IFN- γ realizou um papel fundamental na inibição de *Toxoplasma gondii* nestas células.

REFERÊNCIABIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA J, ESKO, J D. Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfato/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 Biological Chemistry*, v. 276, n. 8, p. 5876-5882, 2001.

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

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

BOOTHROYD J. C, GRIGG M. E. 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.

CARRUTHERS V. B, HAKANSSON S, GIDDINGS O. K, SIBLEY L. D. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infection and Immunity*, v. 68, p 4005-4011, 2000.

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

DENKERS E.Y, GAZZINELLI R.T. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology*, v.11 p.569-88, 1998.

ESKO JD, LINDAHL U. Molecular diversity of heparan sulfate. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 108, p.169-73, 2001.

GAZZINELLI R.T, BREZIN A, LI Q, NUSSENBLATT R.B, CHAN C.C. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Experimental Parasitology*, v.78, p.217-29, 1994.

GAZZINELLI R.T, HAKIM F.T, HIENY S, SHEARER G.M, 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 S.J, LAND J.M, THOMPSON E.J. The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 4, p. 212-216, 1998.

GLASNER P.D, SILVEIRA C, KRUSZON-MORAN D, MARTINS M.C, BURNIER JUNIOR M, SILVEIRA S, CAMARGO M.E, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *American Journal of Ophthalmology*, v.114, p.136-44, 1992.

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 S.K, TAYLOR G.A, WEISS L.M. Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infection and Immunity*, v.69, p.5573-6. 2001.

JONES J.L, LOPES A, WILSON M, SCHULKIN J, GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstetric and Gynecology Survey*, v.56, n.5, p.296-305, 2001.

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 and Immunity*, v. 69, p. 2920-2927, 2001.

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.

KORN, E. D., PAYZA A. N. Bacterial degradation of heparin. *Nature (London)* v.177, p.88-89, 1956.

LINHARDT, R. J., TURNBULL, J. E., WANG, H.-M., LOGANATHAN, D. & GALLAGHER, J. T. Examination of the Substrate Specificity of Heparin and Heparan Sulfate Lyases. *Biochemistry*, v.29, pag.2611-2615, 1990.

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 Infectious Diseases*, v.5, p.211-22, 1992.

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

NICHOLSON D.H, WOLCHOK E.B. Ocular toxoplasmosis in an adult receiving long-term corticosteroid therapy. *Archives of Ophthalmology*, v.94, p.248-54, 1976.

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 Biological Chemistry*, v.274, p.1267-76. 1999.

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

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

ROZENFELD C, MARTINEZ R, FIGUEIREDO R.T, BOZZA M.T, LIMA F.R.S, PIRES A.L, SILVA P.M 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, p.2047-2057, 2003.

SCHERRER J, ILIEV M.E, HALBERSTADT M, KODJIKIAN L, GARWEG J.G. Visual function in human ocular toxoplasmosis. *The British Journal of Ophthalmology*, v.91, p.233-6, 2007.

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 L.D, HAKANSSON S, CARRUTHERS V.B. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Current Biology*, v. 8, p.12-4, 1998.

SMITH J.R, FRANC D.T, CARTER N.S, ZAMORA D, PLANCK S.R, ROSENBAUM JT. Susceptibility of retinal vascular endothelium to infection with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Investigate Ophthalmology and Vision Science*, v.45, p.1157-61, 2004.

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

YAP G.S, 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.