

# Rol de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en la activación de la respuesta inmune en mujeres embarazadas.

Role of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in immune responses in pregnant women.

Amilcar Flores León<sup>1,a</sup>, N. Marisol Córdova Rojas<sup>2,b</sup>, Karina Mamani Herrera<sup>3,c</sup>, Emilse Egüez Suarez<sup>3,d</sup>

## Resumen

**Objetivos:** el estudio tuvo como objetivo evaluar in vitro el rol de anticuerpos anti *T. gondii* en la activación de la respuesta inmune en mujeres embarazadas. **Métodos:** el estudio se realizó con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica (n=15) que fueron estimuladas en presencia y ausencia de plasma autólogo (PA) (anticuerpos anti *T. gondii*). **Resultados:** los datos muestran que en PBMC estimuladas en ausencia de plasma autólogo existe mayor proliferación celular ( $P < 0.05$ ) que células en presencia de plasma autólogo. Niveles de IFN- $\gamma$  producidos en ambas condiciones (PA y SBF) fueron similares. Comparando la producción de IFN- $\gamma$  vs IL-10 muestra mayor producción de citoquinas Th1. **Conclusiones:** en general nuestros resultados sugieren que los anticuerpos presentes en el plasma autólogo modulan la respuesta inmune en mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica, de tal modo que el sistema inmune no exacerbe o inhiba esta respuesta específica. La presencia de anticuerpos anti *T. gondii* no influyen en producción de IFN- $\gamma$  en mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica, pero si en la proliferación celular.

**Palabras claves:** Toxoplasmosis crónica en mujeres embarazadas, Anticuerpos anti *Toxoplasma gondii*, Citoquinas, Proliferación celular.

## Abstract

**Objectives:** the study aimed to evaluate in vitro the role of anti *T. gondii* in activating immune responses in pregnant women. **Methods:** the study was performed with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of pregnant women with chronic toxoplasmosis (n = 15) were stimulated in the presence and absence of autologous plasma (PA) (anti *T. gondii* antibody). **Results:** the data show that in PBMC stimulated in the absence of autologous plasma there is increased cell proliferation ( $P < 0.05$ ) than cells in the presence of autologous plasma. Levels of IFN- $\gamma$  produced in both conditions (PA and SBF) were similar. Comparing the production of IFN- $\gamma$  vs IL-10 shows increased production of Th1 cytokines. **Conclusions:** in general, our results suggest that the antibodies present in autologous plasma modulate the immune response in pregnant women with chronic toxoplasmosis, such that the immune system does not exacerbate or inhibit this specific response. The presence of antibodies to *T. gondii* not affecting IFN- $\gamma$  production in pregnant women with chronic toxoplasmosis, but if cell proliferation.

**Keywords:** Chronic Toxoplasmosis in pregnant women, anti-*Toxoplasma gondii* antibodies, cytokines, cell proliferation.

La toxoplasmosis es una zoonosis causada por *Toxoplasma gondii*, parásito intracelular obligado. Es capaz de producir morbimortalidad grave cuando afecta al embrión, al feto o a un individuo inmunodeficiente. En el ser humano inmuno competente, tan sólo el 10% de las infecciones cursa con manifestaciones clínicas, generalmente leves: linfadenopatías, hepatomegalia y fiebre<sup>1</sup>. Se estima que cerca de un tercio de la población mundial está infectada por *T. gondii*<sup>2,3</sup>, con mayor prevalencia en regiones húmedas y calurosas<sup>4,5</sup>.

La mayoría de las infecciones por *T. gondii* en humanos son asintomáticas, sin embargo, una infección primaria en mujeres embarazadas puede resultar en un daño severo al feto o causar aborto. La frecuencia de transmisión vertical se incrementa con la edad gestacional. Se estima que la tasa de transmisión al feto es del 15% si la infección materna es adquirida durante el primer trimestre, 30% durante el segundo y 60% en el tercero<sup>6,7</sup>.

La infección por *T. gondii*, genera en el individuo una respuesta inmune de tipo humoral y celular. Los anticuerpos presentes se ponen en evidencia con técnicas de laboratorio

específicas. Las pruebas utilizadas detectan anticuerpos específicos anti-*T. gondii*, tipo IgG e IgM<sup>8</sup>, siendo las IgM indicadores de infección aguda. Las IgG presentan el pico de concentración entre 6 y 8 semanas luego de la infección y se mantienen en forma indefinida, por ende no sirven para diagnosticar infección aguda<sup>9</sup>.

La protección del huésped frente a *T. gondii* resulta de una respuesta inmune mediada por células con producción de citoquinas proinflamatorias que incluyen interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleuquina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), esta respuesta se caracteriza por ser una respuesta Th1. Durante la fase inicial de la infección, los neutrófilos, macrófagos y células asesinas naturales (NK) constituyen la principal respuesta del hospedero, mediante la fagocitosis, toxicidad celular y la producción de IFN- $\gamma$ <sup>7,9,10</sup>. Los macrófagos activados por IFN- $\gamma$  inhiben la replicación del parásito a través de un número de mecanismos microbicidas potentes tales como el oxidativo y no oxidativo, así como también la inducción por IFN- $\gamma$  de indoleamina 2,3-dioxigenasa que degrada el triptófano, el cual se requiere para la replicación del *T. gondii*<sup>7</sup>.

La acción combinada de citoquinas como IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  protege al huésped contra la rápida replicación de los taquizoítos y posteriores cambios patológicos. Luego de la invasión del enterocito, el *T. gondii* infecta las células presentadoras de antígeno en la lámina propia del intestino e induce una respuesta transitoria y local de Th1<sup>9,11</sup>.

Dentro del anterior contexto, el presente estudio evaluó in

<sup>1</sup>Laboratorios de Investigación Médica (LABIMED), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBISMED), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

<sup>3</sup>Hospital Materno Infantil Germán Urquidí. Cochabamba, Bolivia.

<sup>4</sup>Biólogo; <sup>5</sup>Bioquímica-farmacéutica; <sup>6</sup>Estudiante de medicina; <sup>8</sup>Ginecóloga-Obstetra

\*Correspondencia a: Amilcar Flores León.

Correo electrónico: leonamilcar@hotmail.com

Recibido el 11 de noviembre 2013. Aceptado el 29 de noviembre de 2013

vitro el rol de anticuerpos anti-*T. gondii* y el papel del IFN- $\gamma$  (TH1) e IL-10 (TH2), en la activación de la respuesta inmune para el control de la infección, en mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica.

## Materiales y métodos

### Área de Estudio

El trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de Investigación Médica (LABIMED) - IIBISMED de la Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón.

### Grupo de Estudio

Se reclutaron para este estudio a 15 mujeres entre 15 a 20 años, embarazadas (tercer trimestre de gestación) con toxoplasmosis crónica, previo consentimiento informado, que asistieron al control prenatal del Hospital Materno Infantil Germán Urquidí (Cochabamba, Bolivia), entre los meses de junio a septiembre del 2012. Los criterios de inclusión fueron: mujeres embarazadas con serología IgG positiva para *T. Gondii*. Fueron excluidas del estudio: mujeres embarazadas con serología IgG negativa o IgM positiva para *T. gondii*.

### Recolección de Muestras

Se recolectó 9 ml de sangre periférica en tubos heparinizados estériles, libres de endotoxina para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), y 1 ml de sangre total fue recolectado en tubo seco para la determinación de anticuerpos anti-*T. gondii*. Las muestras de sangre fueron tomadas en ayunas de por lo menos de 8 horas.

### Determinación de anticuerpos IgG e IgM anti-*T. gondii*

La determinación de anticuerpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, en suero obtenido de mujeres embarazadas, se realizó utilizando la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) siguiendo las especificaciones del kit (Globe Diagnostics SRL. Italy).

### Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se realizó por centrifugación sobre gradiente de densidad Nycopret (Nycomed Pharma AS. Oslo. Norway) previa dilución del paquete globular (1:5) con RPMI-1640 conteniendo 100 U penicilina/ml, 100  $\mu$ g de estreptomycin/ml (RPMI P/S) (todo Cambrex Bio Science). Una vez recuperado el anillo de PBMC se ajustaron las células a una concentración final de 2 millones de células/ml. Estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Para determinar el efecto de los anticuerpos anti-*T. gondii*, PBMC (2 x 10<sup>6</sup> cels/mL) de mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica, fueron cultivados por duplicado en placas de 96 pocillos fondo plano, en RPMI P/S por 6 días a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa, en presencia de plasma autólogo y/o suero bovino fetal (SBF). En estas condiciones PBMC fueron estimuladas en tres condiciones diferentes: síntesis espontánea (control negativo de proliferación), estimula-

ción con antígeno lisado de *T. gondii* (Ag toxo) (50  $\mu$ g/ml) y Enterotoxina Estafilocócica B (SEB) 100ng/mL como control positivo de proliferación. Posterior al cultivo, las células fueron centrifugadas y los sobrenadantes fueron conservados a -80 °C para el análisis de citoquinas Th1 y Th2.

### Medición de la respuesta celular

La proliferación celular se midió por el método de Ioduro de Propidium (PI), intercalante de bases de DNA, esta no atraviesa la membrana celular de manera directa, por lo que fue necesario permeabilizar la membrana celular para marcar las células a nivel de DNA. La medición de proliferación celular se realizó en el equipo Fluoroskan Ascent (parámetros de medición 538 nm de excitación y 612 nm de emisión).

### Cuantificación de citoquinas

La cuantificación de IL-10 e IFN- $\gamma$  fue empleada como marcador de la respuesta Th1/Th2 respectivamente. Niveles de estas citoquinas fueron medidos en los sobrenadantes del cultivo celular mediante la técnica de ELISA, para lo cual se empleó el Kit de INF- $\gamma$  (R&D Systems. INC, Minneapolis, EEUU); Kit de IL-10 (R&D Systems. INC, Minneapolis EEUU). El ensayo fue calibrado para detectar INF- $\gamma$  e IL-10 dentro de un rango de 1000 a >8 pg/mL y 4000 a >32pg/mL respectivamente.

### Análisis Estadístico

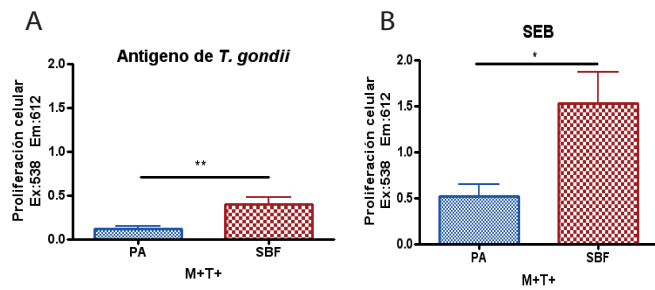
Los resultados en la proliferación celular fueron expresados como media aritmética  $\pm$  desviación estándar (DE). En la cuantificación de citoquinas se expresaron como media aritmética  $\pm$  error estándar (SEM). La comparación estadística de la proliferación celular y cuantificación de citoquinas entre las condiciones estudiadas fueron desarrollados con la prueba U de Mann Whitney. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete estadístico Graphpad Prism Software versión 4,03 (San Diego, CA.), las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

## Resultados

Para determinar si los anticuerpos anti-*T. gondii* presentes en el plasma de mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica (M+T+) tiene un efecto en la proliferación celular frente a una posible reinfección con el agente causal, se procedió a realizar un modelo experimental in vitro que pueda simular este evento, entonces las PBMC fueron estimuladas con Ag toxo y SEB, en presencia de plasma autólogo (PA) y SBF.

El organismo materno provoca una tolerancia inmune: El reconocimiento de los Ac maternos a antígenos de toxoplasma induce una tolerancia en los linfocitos T y B específicos de mujeres embarazadas.

La figura 1A muestra una comparación de los valores de proliferación de PBMC estimuladas con Ag toxo en presencia de PA y SBF, los resultados muestran que existe mayor proliferación celular en presencia de SBF que en presencia de plasma autólogo (PA= 0,11 $\pm$ 0,13; SBF= 0,39 $\pm$ 0,33) diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  U de Mann Whitney). La



**Figura 1. A y B** Proliferación celular de PBMC en mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica (M+T+) en presencia de plasma autólogo y SBF, cultivadas durante 6 días en estufa a 37°C con 5% de CO2 estimuladas con a) Ag toxo b) SEB. Diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,005$ .

figura 1B, muestra la proliferación celular de PBMC estimuladas con SEB (Control Positivo), en la cual se observa mayor proliferación celular en presencia de SBF comparando con el PA (PA =  $0,52 \pm 0,49$ ; SBF =  $1,53 \pm 1,31$ ) diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$  U de Mann Whitney).

Estos resultados muestran el rol inmunomodulador de los anticuerpos presentes en mujeres embarazadas.

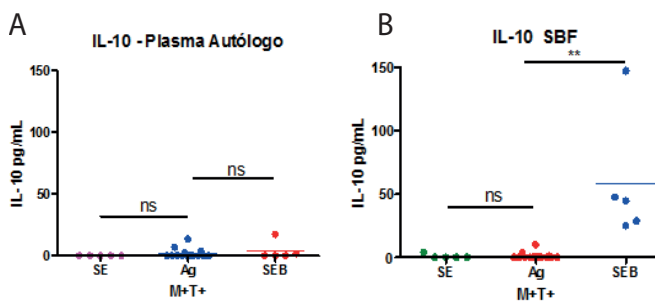
**Mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica muestran una disminución de la actividad inflamatoria de la inmunidad celular.**

La figura 2 muestra la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 por PBMC estimuladas en tres condiciones: Ag toxo, SEB y producción espontánea como control negativo (SE), en presencia de plasma autólogo y/o SBF.

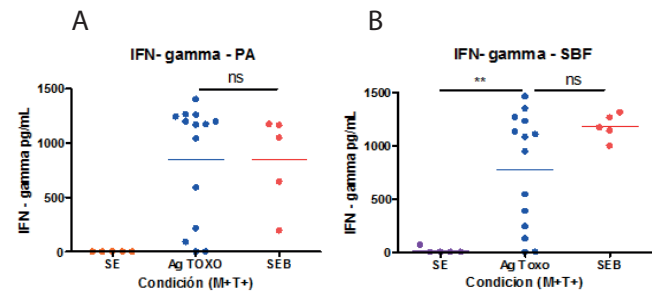
La figura 2 (A y B) muestra que los niveles de IFN- $\gamma$  producidos por las PBMC en las tres condiciones, estimulados en presencia de PA y SBF, no muestran diferencias estadísticas significativas entre ambas condiciones (SE = 0; Ag =  $845,4 \pm 144$ ; SEB =  $844,8 \pm 189,3$ pg/ml respectivamente).

Mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica muestran una disminución de los niveles de IL-10.

La figura 3 (A y B) muestra la producción de IL-10 por PBMC en presencia de PA y SBF. Los resultados muestran que no existe diferencias estadísticas significativas entre la síntesis espontánea y Ag toxo, sin embargo si se observa producción de IL-10 por las PBMC cuando son estimuladas con SEB.



**Figura 3. A y B** Respuesta inmune de PBMC en mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica (M+ T+) en tres condiciones: síntesis espontánea (S.E), Ag toxo (50µg/ml) y SEB (100 ng/ml), después de un cultivo de 6 días a 37°C con 5% de CO2 en presencia de: a) plasma autólogo. b) Suero Bovino Fetal. \*\*Diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$ ; ns No existe diferencias significativas.



**Figura 2. A y B** Producción de IFN- $\pm$  en sobrenadantes de PBMC, en mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica (M+T+), que fueron estimuladas durante 6 días a 37°C con 5% de CO2 en tres condiciones: SE, Ag toxo (50 µg/ml) y SEB (100 ng/ml) en presencia de: a) plasma autólogo, b) suero bovino fetal. ns No existe diferencia estadísticamente significativa. \*\*Existe diferencia estadísticamente significativa  $p > 0,05$ .

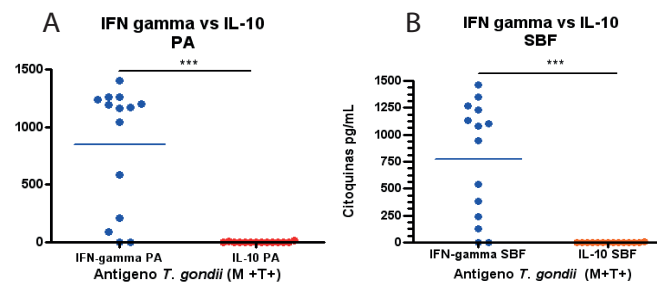
Una importante respuesta inmune tipo TH1 se observa en respuesta a Ag de *Toxoplasma gondii*.

La figura 4 (A y B) muestra una comparación entre los niveles de producción de INF- $\gamma$  e IL-10 en presencia de PA, los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambos INF- $\gamma$  e IL-10 (INF- $\gamma$ :  $845,4 \pm 144,0$ ; IL-10 =  $1,874 \pm 1,040$ pg/ml), del mismo modo en la figura 4b se observa un comportamiento similar de producción de ambas citoquinas, en presencia de SBF cuyas diferencias son estadísticamente significativas (INF- $\gamma$  =  $777,2 \pm 143,1$ ; IL-10 =  $1,01 \pm 0,73$  pg/ml).

**Discusión**

Para determinar el efecto de los anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en la respuesta inmune celular realizamos estimulaciones de PBMC con Ag soluble de toxoplasma en presencia de plasma autólogo, que presenta anticuerpos anti-*T. gondii* y en ausencia del mismo para determinar el efecto de estos en la proliferación celular.

Nuestros resultados muestran que PBMC de mujeres embarazadas estimuladas con Ag de *T. gondii* y SEB en ausencia de anticuerpos, muestran mayor proliferación celular comparando con PBMC en presencia de plasma autólogo (fig. 1 A y B), esto sugiere que el sistema inmune en presencia de PA



**Figura 4. A y B** Producción de IFN- $\pm$  e IL-10 en respuesta al Ag toxo por PBMC de mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica (M+ T+). Los resultados de la medición de niveles de citoquinas son expresados como media aritmética  $\pm$  SEM pg/ml y las diferencias entre las condiciones son mostrados como:  $p < 0,05$  (Mann Whitney U Test). \*\*\* Diferencia estadísticamente significativa.

y SBF está activado, sin embargo, la proliferación celular en presencia de anticuerpos esta disminuida, esto podría deberse a la presencia de los anticuerpos IgG específicos y linfocitos de memoria como lo reportan también, Romero A.T. 2001 y Mollinedo P. 2005, en mujeres embarazadas, los cuales indican que al presentar anticuerpos IgG anti-*T. gondii* antes del embarazo queda inmunizada contra la enfermedad ya que posee defensas inmunológicas que protegerán a la gestante y al feto contra futuras reinfecciones<sup>11,12</sup>.

Pezerico y col. 2009, realizaron estudios en modelo de ratones BALB/c que fueron re infectados con *T. gondii* durante el embarazo, estos ratones infectados crónicamente no mostraron reinfección durante el embarazo<sup>13</sup>, nuestros resultados in vitro indican que las PBMC de mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica al entrar en contacto con el antígeno de toxoplasmosis (asumiendo una re-infección in vitro) tienen menor proliferación frente a PBMC en ausencia de PA, esto es debido a que la respuesta inmune será mucho más rápida por la exposición al mismo antígeno por segunda vez y por la presencia de memoria inmunológica frente al parásito<sup>14</sup>.

Es conocido que los anticuerpos (IgG), forman parte de la inmunidad adquirida humoral que se desarrolla cuando el organismo está expuesto a antígenos, estos anticuerpos atacan a un antígeno específico y facilitan la destrucción del antígeno por parte de los fagocitos<sup>15</sup>. Estudios realizados en ratones que carecen de células T han demostrado que el suero inmune, por sí mismo, no es protector<sup>16</sup>.

Asimismo, otros estudios han demostrado que ratones deficientes en linfocitos B mueren durante la infección secundaria por *Toxoplasma*, con una gran cantidad de *taquizoítos* en el cerebro y pulmones, indicando que las células B juegan un papel importante en la resistencia a la infección activa persistente, probablemente a través de la producción de anticuerpos específicos<sup>17</sup>. Respecto a este hecho, nuestros resultados indican que las PBMC de mujeres embarazadas, estimuladas con SBF en ausencia de anticuerpos mostraron niveles más elevados de proliferación sugiriendo que el sistema inmune no solo depende de esta vía (inmunidad humoral) para el control de la infección puesto que también podría haber otras vías de acción frente al agente patógeno como el sistema de complemento y otros<sup>18</sup>.

Se sabe que el IFN- $\gamma$  es una citoquina Th1 producida por linfocitos T activados. Macrófagos y células NK, participan también en la respuesta inmunitaria mediada por las células e inhibe la proliferación Th2, disminuyendo la inmunidad humoral<sup>19</sup>. Se ha demostrado también que el IFN- $\gamma$  tiene la capacidad de inhibir la proliferación de *T. gondii* por activación de células endoteliales de venas umbilicales humanas<sup>12</sup>.

En nuestro estudio los niveles de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de PBMC, estimulados con Ag de *T. gondii* en presencia

y ausencia de anticuerpos fueron similares, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas (fig. 2 A y B), estos resultados indican que los anticuerpos anti-*T. gondii* no influyen en la producción de IFN- $\gamma$ , pero si en su activación y regulación, ya que se observó mayor proliferación celular en PBMC estimuladas en ausencia de anticuerpos. En cambio los niveles de IFN- $\gamma$  producidos en la condición de SEB (control positivo) fueron menores en presencia de plasma autólogo, con respecto a la producción de IFN- $\gamma$  con SBF. Es tal la importancia del IFN- $\gamma$  en la respuesta inmunitaria contra el parásito, que estudios realizados en murinos, demuestran que la neutralización de la citoquina lleva a la muerte de los animales infectados por una cepa habitualmente no virulenta, reactivando la infección crónica por ruptura de los quistes<sup>12</sup>. Es innegable la función esencial de las citoquinas proinflamatorias para la resolución de la toxoplasmosis; sin embargo, su producción excesiva es perjudicial para el hospedero y también durante el embarazo debido a que en modelos animales produce abortos espontáneos y recurrentes<sup>20,21</sup>.

Con respecto a los niveles de IL-10 (fig. 3 A y B) en PBMC estimulados con Ag de *T. gondii* fueron similares en presencia y ausencia de anticuerpos, sin embargo, con SEB en ausencia de plasma autólogo los niveles de IL-10 fueron mayores que en presencia de plasma autólogo, esto se debe a que el SEB es un súperantígeno que va estimular la producción de respuesta tanto Th1 como Th2 y de esta manera tener una respuesta inmune incrementada.

Los resultados de la (fig. 4 A y B) concuerdan con lo señalado por Ki-Man Kang 2006, que en ratones BALB/c infectados con *T. gondii* evidenció una respuesta Th1<sup>15</sup>. También nuestros resultados son corroborados con la investigación de Fatoohi y col. 2002, quien encontró alta producción de IFN- $\gamma$  y menor producción de IL-4 como respuesta al Ag soluble de *Toxoplasma* en mujeres embarazadas infectadas crónicamente<sup>22,23</sup>.

En conclusión, podemos indicar que la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* presentes en el plasma modulan la respuesta inmune en mujeres embarazadas con toxoplasmosis crónica, de tal modo que el sistema inmune no se exacerbe provocando el aborto en la madre o inhiba esta respuesta específica. Estos anticuerpos anti-*T. gondii* no influyen en la producción de IFN- $\gamma$ , pero si en la proliferación celular y la respuesta inmune específica de estas mujeres embarazadas se encuentra polarizada hacia una respuesta Th1, debido a que se encontró mayor producción de IFN- $\gamma$  y bajos niveles de IL-10.

**Agradecimientos:** Un sincero agradecimiento a la Agencia de Cooperación Sueca (ASDI), IIBISMED, LABIMED y al personal del HMIGU.

**Conflictos de interés:** Los autores declaramos no tener conflicto de intereses, en relación a este artículo.

## Referencias bibliográficas

1. Roc ML, Palacian MP, Lomba E. Diagnóstico serológico de los casos de toxoplasmosis congénita. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28(8):517-519.
2. Alvarado-Esquivel C, Sifuentes-Álvarez A, Estrada-Martínez S, Rojas-Rivera A. Conocimientos y prácticas sobre toxoplasmosis en médicos que atienden a mujeres embarazadas en Durango, México. *Órgano Oficial de la Academia Nacional de Medicina de México, AC.* 2011; 147: 311-24.
3. Botero D, Restrepo M. *Parasitología Humana*. Medellín. Editorial Corporación para Investiga-



- ciones Biológicas. 2003.
4. Plazola CN, Pérez SH, Figueroa DR. Daño neonatal severo debido a toxoplasmosis congénita. Departamento de Infectología e Inmunología. *Pediatr Reprod Hum* 2010; 24 (4): 242-247.
5. Rosso F, Agudelo A, Isaza A, Montoya JG. Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo. *Colomb Med* 2007; 38(3): 316-337.
6. Muñiz HS, Mondragón FR. *Toxoplasma gondii*, Un Patógeno Asesino Re-Emergente. *Rev Educ Bioq* 2009; 28(2): 52-58.
7. Sánchez LR, Couret CM, Ginorio GD, Nodarse RA, Sanchez RN, Soler GI, et al. Toxoplasmosis y embarazo. *Toxoplasmosis and pregnancy. Rev Cubana Obstet Ginecol* 2012; 38(1): 99-106.
8. Durlach R, Kaufel F, Carral L, Freuler C, Cerriotto M, Rodriguez M, et al. Consenso argentino de toxoplasmosis congénita. *Medicina (B. Aires)*. 2008; 68 (1): 75-87.
9. Díaz L, Zambrano B, Chacón G, Rocha A, Díaz S. Toxoplasmosis y embarazo. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2010; 70(3):190-205.
10. Uribarren BT. Toxoplasmosis. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina UNAM 23/10/2012.
11. Mollinedo PS. Toxoplasmosis. 14/11/2005.
12. Romero AT, Rincón de HW, Molina VR, Ruiz A, Gonzales E, Estévez J. Interferón-gamma, caquectina e interleucina-10 en suero de embarazadas con toxoplasmosis latente. *Gac Méd Caracas* 2001; 109(1): 60-66.
13. Pezerico SB, Langoni H, Da Silva AV, Da Silva RC. Evaluation of *Toxoplasma gondii* placental transmission in BALB/c mice model. *Exp Parasitol* 2009; 123(2): 168-72.
14. Rojas W. Inmunología de Rojas. Decimocuarta ed. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007.
15. Ki-Man Kang, In-Uk Choi, Dae-Whan Shin, Young-Ha Lee. Cytokine and antibody responses of reactivated murine toxoplasmosis upon administration of dexamethasone. *Korean J Parasitol* 2006; 44(3): 209-219.
16. Johnson LL, Sayles PC. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4 - deficient mice. *Infect Immun* 2002; 70(1): 185-191.
17. Kang H, Remington JS, Suzuki Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 2000; 164(5): 2629-34.
18. Brandan N, Aquino EJ, Codutti A, Respuesta Inmunitaria. Facultad de Medicina UNNE.2007.
19. Reyna E, Mejia J, Reyna N, Torrez D, Santos J, Perozo J. Concentraciones de interferón gamma en preeclámpticas y embarazadas normotensas sanas. *Clin Invest Gin Obst* 2012; 39(3): 108-12.
20. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994; 153: 2533-2543.
21. Rico RM, Vega RG. Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo. *Ginecol Obstet Mex* 2012; 80(5): 332-40.
22. Fatoohi AF, Cozon GJN, Greenland T, Ferrandiz J, Bienvenu J, Picot S, et al. Cellular Immune Responses to Recombinant Antigens in pregnant women chronically Infected with *Toxoplasma gondii*. *ClinDiagn Lab Immunol* 2002; 9(3): 704-7.
23. Giraldo RML. Toxoplasmosis. Programa de Educación Médica Continua Certificada. Universidad de Etiopia 2008; 14: 7-8.