



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA
CIENCIAS MÉDICAS

Toxoplasmosis congénita: relación entre el perfil de la respuesta inmune y el perfil clínico

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

Valeria Gómez Toscano

TUTORA

Dra. María Dolores Correa Beltrán

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Cd. México, octubre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Dios, por bendecirme y amarme tanto

A mis hijos Regina y Guillermo por ser el centro de mi vida y permitirme trabajar en esta tesis

A mi esposo por su amor incondicional y acompañarme en mi camino profesional

A mi mamá por su apoyo incansable para que esto sea posible

A mi papá por ser una parte fundamental de mi vida

A mis hermanos por su cariño y amor

Muy especialmente a mi tutora de tesis Dra. Dolores Correa Beltrán por permitirme ser su alumna desde la especialidad, pero sobre todo por su comprensión, paciencia y ayuda en los momentos más difíciles

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Dolores Correa Beltrán por toda su dedicación y enseñanzas a lo largo de este camino

A todas las personas que integran el laboratorio de Inmunología experimental por su amable apoyo para que este proyecto se haya llevado a cabo y sea posible escribir esta tesis

A los médicos del Instituto Nacional de Pediatría que se han preocupado por participar activamente en este proyecto y han dado seguimiento a nuestros pacientes

A mis profesores de esta maestría en ciencias de la salud por su paciencia y entrega generosa

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto Nacional de Pediatría por permitirme realizar mis estudios de posgrado

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría, en el Laboratorio de Inmunología Experimental y los Servicios de Infectología, Neurología, Oftalmología, Audiología y Laboratorio de Seguimiento del Neurodesarrollo.

Formó parte del proyecto 060/2008 del INP y recibió apoyo del Programa de recurso Fiscal E022 del INP y del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social-CONACYT, No. 139721.

INDICE

RESUMEN ESTRUCTURADO	5
SUMMARY	6
ANTECEDENTES	7
<i>Toxoplasma gondii</i> . Aspectos biológicos	7
Morfología.....	7
Ciclo de vida.....	8
Ciclo celular	8
Transmisión.....	10
Clasificación clínica de la toxoplasmosis en seres humanos.....	10
Epidemiología	12
Virulencia del parásito.....	14
Respuesta Inmune.....	17
Cuadro clínico de la toxoplasmosis congénita	21
Diagnóstico.....	24
Tratamiento	25
Pronóstico.....	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVO GENERAL	27
HIPÓTESIS	27
METODOLOGÍA.....	28
Tipo de estudio	28
Población objetivo.....	28
Población elegible	28
Criterios de selección	28
Estrategia general	28
Muestras y estrategia experimental	29
Ubicación del estudio	32
Definición de variables.....	33
Tamaño de muestra	37
Análisis estadístico	38
Aspectos éticos	38
RESULTADOS	40
Aspectos clínicos.....	40
Relación de cuadro clínico con perfil de respuesta inmune.....	44
DISCUSIÓN.....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMEN ESTRUCTURADO

Antecedentes. La toxoplasmosis es una zoonosis de distribución mundial. La prevalencia varía según la localización geográfica de 0.01 a 0.3%. Tanto la transmisión como la patología en el producto dependen de la carga parasitaria y el momento del embarazo en el que ocurre la infección en la madre. La respuesta inmune de la madre y el embrión/feto también son aspectos que determinan la probabilidad de transmisión vertical y el daño. La hipótesis de este trabajo fue que el perfil inmune Th1 regulado de recién nacidos con toxoplasmosis congénita se relaciona con manifestaciones clínicas localizadas, mientras que el perfil inmune Th1 no regulado o el perfil Th2 se asocian con presencia de manifestaciones clínicas diseminadas o graves. **Objetivo.** Determinar la relación entre el perfil de respuesta inmune y el perfil clínico en recién nacidos con toxoplasmosis congénita. **Material y métodos.** Seguimiento de una cohorte. Se incluyeron recién nacidos con toxoplasmosis congénita que acudieron al INP procedentes del HG Gea González, el CS Rovirosa, el INPer o el INP durante marzo 2014 a febrero 2016, detectados prenatalmente, al nacimiento o durante los primeros 7 días de vida. Se evaluaron sus características clínicas, de laboratorio y gabinete, y se les midieron anticuerpos de todas las clases y subclases por ELISA, así como la síntesis específica de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-4, IL-6, IL8, IL-10 y TGF- β por citometría de flujo. Las variables independientes (localización: neurológica o diseminada, y gravedad: leve vs moderada/grave) se relacionaron con el perfil inmune, comparando los niveles de las respuestas y las proporciones de casos positivos; las pruebas estadísticas fueron la U de Mann Whitney y la Fischer exacta, respectivamente. **Resultados.** Se analizaron 17 pacientes, en los que se encontró una mayor proporción de casos del grupo moderado de proliferación celular de linfocitos totales, y de los CD8+ y CD19+, y de producción de TNF-alfa, IFN-gamma, en comparación con el grupo con infección leve; así mismo, se produjo IL-2, TGF-beta y anticuerpos IgA en mayor proporción en los pacientes que presentaron con clínica localizada con respecto a aquellos con clínica diseminada. **Conclusiones.** La hipótesis fue apoyada parcialmente, pues se encontró mayor regulación en los casos menos graves y localizados.

SUMMARY

Background. Toxoplasmosis is a zoonosis of worldwide distribution. The prevalence varies according to the geographic location from 0.01 to 0.3%. Both the transmission and the pathology in the product depend on the parasitic load and the time of pregnancy in which the infection occurs in the mother. The immune response of the mother and the embryo / fetus are also aspects that determine the probability of vertical transmission and damage. The hypothesis of this work was that a regulated Th1 immune profile of newborns with congenital toxoplasmosis is related to localized and mild clinical manifestations, while the unregulated Th1 immune profile or the Th2 profile are associated with the presence of disseminated or severe clinical manifestations. **Objective.** To determine the relationship between the profile of immune response and the clinical profile in newborns with congenital toxoplasmosis. **Material and methods.** Follow-up of a cohort. We included newborns with congenital toxoplasmosis who came to the INP from HG Gea González, CS Rovirosa, INPer or INP during March 2014 to February 2016, detected prenatally, at birth or during the first 7 days of life. Their clinical, laboratory and cabinet characteristics were evaluated, and antibodies of all classes and subclasses were measured by ELISA, as well as the specific lymphocyte proliferation and synthesis of TNF- γ , IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-4, IL-6, IL8, IL-10 and TGF- β by flow cytometry. The independent variables (localization: neurological vs disseminated, and severity: mild vs moderate / severe) were related to the immune profile, comparing the response levels and proportions of positive cases; the statistical tests were the Mann Whitney U and the exact Fischer, respectively. **Results.** 17 patients were analyzed, a higher proportion of cases of the group with moderate disease had total, CD8 + and CD19 + lymphocyte proliferation, and production of TNF-alpha, IFN-gamma, higher in comparison with the group with mild infection. Likewise, IL-2, TGF-beta and IgA antibodies were produced in greater proportion in the patients who presented localized clinical symptoms compared to those with disseminated disease. **Conclusions** The hypothesis was partially supported, since greater regulation was found in less severe and localized cases.

ANTECEDENTES

Toxoplasma gondii. Aspectos biológicos

La toxoplasmosis es ocasionada por el protozooario *Toxoplasma gondii*. Este parásito es una sola especie, y fue descubierto por Nicolle y Monceaux en 1908.¹ Pertenece al Phylum Apicomplexa, por el complejo apical de su parte anterior (figura 1). Infecta a todos los animales homeotermos, de tierra, aire y agua.^{1,2}

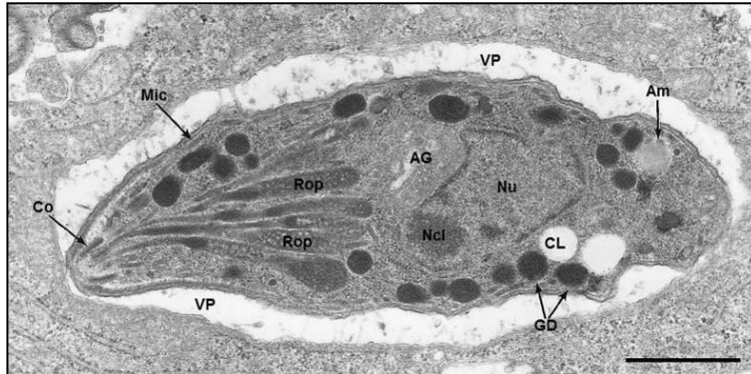


Figura 1. Taquizoito de *Toxoplasma gondii* dentro de una vacuola parasitófora (VP). Se pueden observar el Complejo apical (Co), los Micronemas (Mic), las Roptrias (Rop), el Aparato de Golgi (AG), los Gránulos Densos (GD) y las vacuolas de amilopectina (Am) y de lípidos (CL).

Modificado de Dubey et al, 1998.

Morfología

Ooquistes: Los **felinos, hospederos definitivos**, eliminan los ooquistes no esporulados con las heces, los cuales se vuelven infectantes al cabo de 1 - 5 días en el ambiente. Los ooquistes esporulados son ovoidales, miden 10 - 12 μm y contienen 2 esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoítos.

Taquizoitos: formas replicativas, que invaden y se replican dentro de cualquier célula nucleada. Se observan en la **fase aguda** y son responsables de la diseminación y la destrucción tisular. Miden 3 μm x 6 μm , de forma oval, con un extremo aguzado y el otro redondeado. Se reproducen rápidamente por división endodiogenia en vacuolas parasitóforas que forman en las células. El conoide, los anillos polares, los micronemas, las roptrias y los gránulos densos son de importancia en la adhesión, la invasión, la formación de la vacuola parasitófora y la adquisición de nutrientes. La replicación conduce a la lisis celular y a la diseminación de taquizoitos a diferentes tejidos, ocasionando necrosis.

Bradizoitos: Los taquizoitos de *T. gondii* se diferencian en formas de muy lento crecimiento, los **bradizoitos**, contenidos en los **quistes tisulares**; miden 1.5 μm x 7.0 μm y su morfología es semejante a la de los taquizoitos. Existen mecanismos por los cuales entran en una etapa "quiescente" (latente). Estas formas, en su conjunto, con su pared, constituyen los quistes tisulares, y dan lugar a inmunidad no estéril; en condiciones de

inmunocompromiso, los bradizoitos que contienen se reactivan y se diseminan como taquizoitos.

Los quistes tisulares varían en forma y tamaño; en promedio miden 70 μm y pueden llegar a contener 1000 bradizoitos, siendo de gran tamaño. Presentan una pared dura, y pueden persistir en tejidos durante el resto de la vida del hospedero. Se ubican principalmente en cerebro, músculo esquelético y cardíaco. Se considera que los quistes tisulares contribuyen de manera fundamental al éxito de este parásito, ya que (1) ingeridos con carne cruda o mal cocida, sobreviven al tránsito por tracto digestivo, lo que permite la invasión del intestino delgado; (2) no son afectados por la respuesta inmune y por los fármacos; (3) los parásitos pueden persistir sin afectar a las células a lo largo de la vida del hospedero; (4) son infectivos, lo que contribuye a su diseminación en la naturaleza a través de animales carnívoros.^{1,3,4}

Ciclo de vida

En la figura 2 se muestra un esquema del ciclo de vida de *T. gondii*. Los félidos domésticos y salvajes son los **hospederos definitivos**. En ellos se llevan a cabo las etapas sexuales y asexuales del ciclo de vida de *T. gondii*, por lo que constituyen también los principales reservorios. Los gatos se infectan habitualmente al ingerir carne contaminada de aves y roedores con **quistes tisulares**, y con poca frecuencia a través de ingesta de ooquistes. Los félidos infectados (una gran mayoría asintomáticos) pueden eliminar hasta 1 millón de ooquistes *no* esporulados por día, 7 - 15 días después de la exposición. En el transcurso de días a semanas, los ooquistes esporulan en un medio ambiente adecuado (cálido, con humedad); en jardines, cajas de arena, pueden permanecer infectantes durante meses.

En el humano y múltiples hospederos intermediarios (mamíferos, aves y otros animales de sangre caliente), después de la ingesta de quistes con bradizoitos u ooquistes con esporozoítos, los parásitos invaden las células de la mucosa del tracto digestivo, se diferencian a **taquizoitos** y **se multiplican** localmente antes de diseminarse por vía sanguínea o linfática a otros órganos. Invaden de manera activa casi cualquier célula, con la formación de una vacuola parasitófora a partir de la membrana citoplásmica del hospedero.

Ciclo celular

T. gondii presenta en su porción apical los organelos comunes de organismos de este Phylum, involucrados en la adhesión e invasión. El complejo interno de membrana y la membrana plasmática forman la tricapa lipídica característica de estos protozoos, también de relevancia en la replicación, la movilidad y la invasión. Una vez que ingresa *T. gondii* a la célula hospedera, se apropia de algunas funciones en beneficio propio. Los antígenos de superficie, y las proteínas y otras moléculas de componentes estructurales del complejo apical, como roptrias, micronemas y gránulos densos, contribuyen de manera importante al reconocimiento de células blanco, la invasión activa, la formación de la vacuola parasitófora y la reproducción, con la lisis final de la célula.⁵ Otras proteínas se consideran efectoras cruciales, pues mantienen un equilibrio en la interacción entre el parásito y la

célula, con gran eficiencia, si se considera la persistencia de la infección con poco o nulo efecto (es decir, sin enfermedad). La persistencia del parásito en el organismo después de la infección primaria, se atribuye en gran medida a los mecanismos que previenen la apoptosis de la célula que lo hospeda.⁶

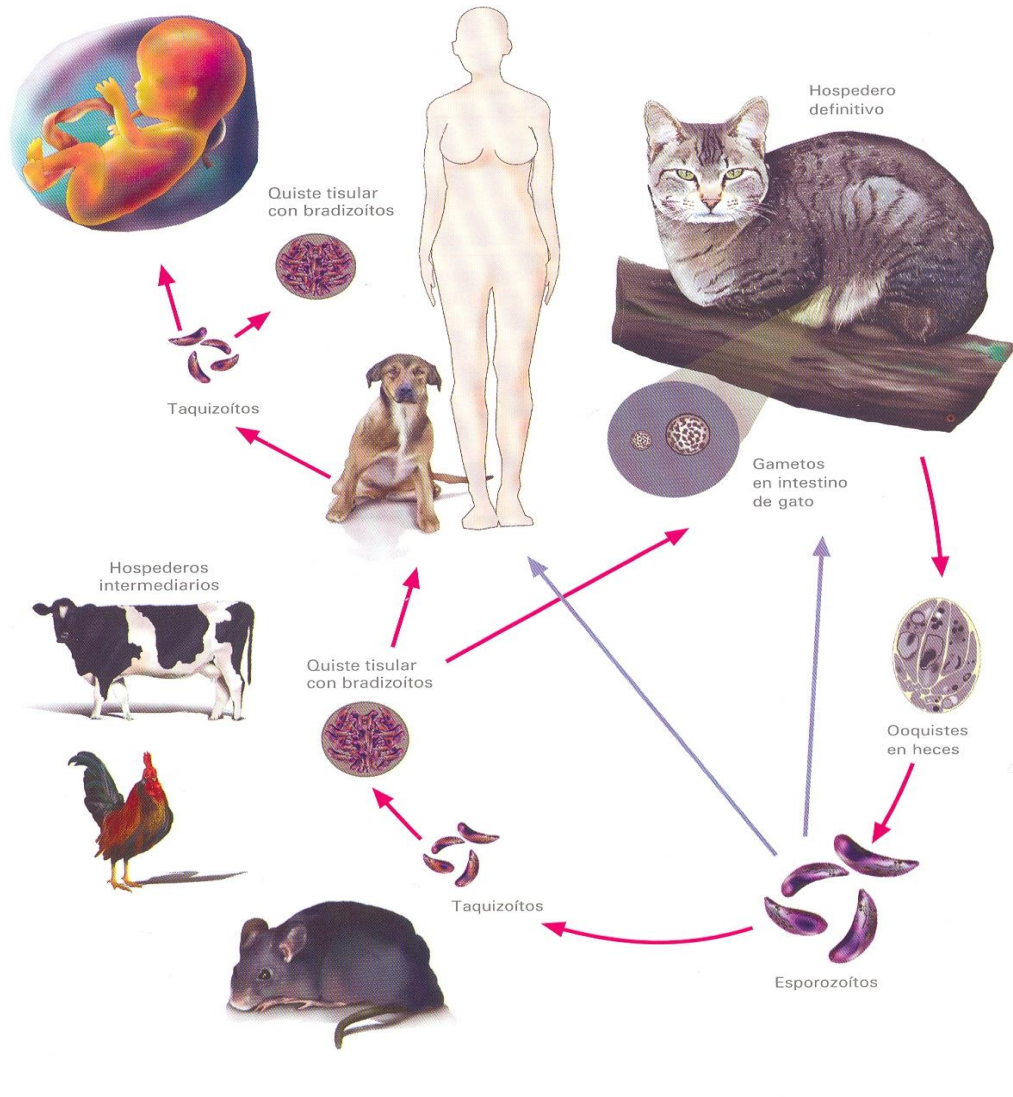


Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Tomado de Correa et al, 2006.

Transmisión

El humano puede adquirir la infección a través de:

- Ingesta de carne cruda/mal cocida contaminada con **quistes tisulares**, por manipulación inadecuada de la misma. Existe evidencia de que el riesgo de contraer la toxoplasmosis es mayor debido a la ingesta de carne de cerdo mal cocida o cruda, pues la carga parasitaria es mayor en estos animales que en otro tipo de ganado, conejos o aves.⁷
- Ingesta de agua/alimentos contaminados con **ooquistes** esporulados, eliminados en materia fecal de gatos; también debe contemplarse la manipulación inadecuada de las cajas de arena de los gatos.⁸
- Transmisión vertical - transplacentaria.
- Otros mecanismos menos frecuentes: trasplante de órganos, transfusión sanguínea e inoculación accidental en laboratorios.^{3,9,10}

Clasificación clínica de la toxoplasmosis en seres humanos

Abarca la infección asintomática, así como la toxoplasmosis adquirida, la congénita, la ocular y la del paciente inmunocomprometido.

Infección asintomática: Se presenta en la mayor parte de los casos. Los sitios extraintestinales que son infectados en primera instancia son los ganglios mesentéricos y el parénquima hepático con rápida regeneración celular.

Infección aguda adquirida: El período de incubación es de 10 - 14 días. Se presenta linfadenitis cervical y occipital moderada, mal estado general; en ocasiones se incluye linfadenopatía supraclavicular e inguinal, fiebre moderada, odinofagia, cefalea y mialgias. También pueden existir hiporexia, náusea, vómito y dolor abdominal. Es posible encontrar hepatoesplenomegalia, síntomas respiratorios o cardiacos, conjuntivitis y rash. El cuadro generalmente se autolimita al cabo de 3- 4 semanas, pero se puede prolongar. El diagnóstico temprano es de vital importancia en mujeres embarazadas debido al riesgo de transmisión fetal.

Infección aguda diseminada: los sitios principales de diseminación son SNC , ojos, corazón, hígado y pulmones, con predilección por sitios donde la respuesta inmune es limitada, con lesiones celulares extensas que pueden conducir a encefalitis, retinocoroiditis, pericarditis, derrame pericárdico, miocarditis, miositis y neumonía intersticial, entre otros. Esto se observa particularmente en sujetos inmunocomprometidos.

Cabe mencionar que los taquizoitos se encuentran en todos los órganos en la infección aguda. La lesión inicial es la necrosis causada por la muerte de las células parasitadas, con una importante reacción inflamatoria aguda. Al avanzar la infección aumenta la infiltración linfocítica, sin formación de granulomas. Los sujetos inmunocompetentes resuelven la infección y los quistes tisulares remanentes (con bradizoitos) no producen reacción.

Toxoplasmosis congénita: Transmisión vertical debida a infección activa en la madre desde tres meses previos al embarazo o a lo largo del mismo, ya sea por reactivación de bradizoitos en fase latente o, más frecuentemente, por infección primaria aguda, aunque hay evidencia acutalmente de que podría haber reinfección con cepas más virulentas.^{11,12} Esta exposición *in utero* a *T. gondii* puede dar lugar a distintas consecuencias, principalmente neurológicas y oculares. La enfermedad grave se presenta en aproximadamente el 10% de los productos infectados *in utero*, aunque una gran proporción de infecciones asintomáticas en el momento del nacimiento redundarán en secuelas antes del año de edad.¹³ En cortes histopatológicos se observan taquizoitos y quistes con bradizoitos en placenta, pero las lesiones necróticas son poco frecuentes.

Toxoplasmosis ocular: derivada de una toxoplasmosis congénita en la mayor parte de los casos, pero los casos de enfermedad adquirida postnatalmente también se detectan.^{14,15} Los principales signos y síntomas de la enfermedad ocular aguda son dolor ocular, fotofobia, lagrimeo y visión borrosa. Los pacientes con lesiones oculares congénitas, a pesar de una detección antenatal oportuna y de tratamiento pre y postnatal, pueden presentar reactivaciones de las lesiones. Es fundamental realizar estudios de seguimiento durante la pubertad y en periodos posteriores para evaluar los resultados a largo plazo y los factores pronósticos involucrados. En un estudio de seguimiento de 477 pacientes en Francia de hasta 22 años, se observó la aparición de nuevas lesiones en la adolescencia (con una probabilidad acumulada del 50%), en pocas ocasiones con disminución grave de la capacidad visual.¹⁶ Las lesiones oculares son necróticas, y con frecuencia destruyen la arquitectura de la retina y involucrando la coroides (retinocoroiditis). Los hallazgos clásicos de retinocoroiditis, que es la lesión ocular más frecuente, incluyen lesiones blanco-amarillentas con reacción inflamatoria en vítreo, con bordes mal definidos, sobre elevados y edema retiniano. La localización más frecuente es en el polo posterior ocular, con tamaño variable, y de forma redondeada u ovalada. Cuando existen cicatrices de lesiones previas, se observan con bordes bien definidos, hiperpigmentados; en ocasiones el pigmento puede apreciarse en toda la lesión.

Toxoplasmosis en el paciente inmunocomprometido: en personas con SIDA u otra causa de inmunocompromiso (trasplante, quimioterapia) es una causa importante de muerte, ya sea por reactivación o -menos frecuente- por infección aguda, con patología principalmente a nivel de SNC: encefalitis necrosante focal, apreciable en neuroimagen con forma semejante a la de un absceso: el signo de tiro al blanco es característico, tanto en la tomografía (TC) como en la resonancia magnética nuclear (RMN) con un absceso de forma anular y un nódulo no central.¹⁷ También se pueden encontrar atrofia cerebral, miocarditis, infiltrados pulmonares progresivos, retinocoroiditis grave con lesiones confluentes y desprendimiento de retina.

La terapia antirretroviral restaura la respuesta inflamatoria en los pacientes con SIDA, y puede poner de manifiesto infecciones subclínicas o exacerbar, de manera paradójica, infecciones oportunistas como, en este caso, la toxoplasmosis. Se considera que hasta el 25% de pacientes que reciben terapia antirretroviral altamente activa (HAART) pueden desarrollar el síndrome inflamatorio de reconstitución inmune.¹⁸

Epidemiología

La infección por *T. gondii* es una de las infecciones latentes más frecuentes en humanos de todo el mundo y México no es la excepción.^{1,19} La seroprevalencia mundial se considera entre 30–50%, pero esto varía de manera importante entre regiones, debido a variables tales como el clima y la presencia de felinos silvestres, ferales y domésticos que deambulan libremente, así como la dieta, la higiene y la susceptibilidad de los hospederos.²⁰ Se detectan títulos significativos de anticuerpos en un 50-80% de los residentes de zonas geográficas como Brasil y Centroamérica. Se observa una prevalencia de infección más alta en los climas cálidos y húmedos.^{1,21,22} La prevalencia es elevada también en lugares donde se consume carne mal cocida o cruda.²³ Se han producido brotes de infección aguda en familias que han consumido el mismo alimento infectado.² En zonas de pobreza en las cuales los niños juegan en el suelo y están expuestos al ambiente desde pequeños, la prevalencia se incrementa desde edades tempranas.^{22,23}

En México se cuenta con estudios usando los bancos de suero de las Encuestas Nacionales realizadas en los años 1987, 2000 y 2006. En la primera se utilizó la técnica de inmunofluorescencia (IFI) y se dividió a la República Mexicana en 3 sectores (norte, sur y costa), con una seroprevalencia resultante de alrededor de un 32%, de mayor magnitud en las costas del país y menor en los estados del norte. Cabe hacer notar que en este estudio existió una representación importante en hombres de los grupos de edad 1-4, 5- 9 y 10-14 años y una escasa representación entre los grupos de 20 a 64 años. En las Encuestas de 2000 y 2006, se encontró un aumento global de 41 a 43%, y un cambio en la distribución por estado, aunque hubo hiperendemicidad en las costas en ambas, hubo una disminución de la frecuencia en las zonas centrales del país.¹⁹ La transmisión inicia en la infancia y la tasa de seroconversión es de 3 - 8%/año. El rango de incidencia oscila entre 12 - 90%, el cual incrementa con la edad; como se mencionó, los factores asociados son educación, alimentación, hacinamiento y hábitos higiénicos.

En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Ciudad de México se realizó un estudio para identificar las principales patologías neurológicas asociadas a VIH/SIDA en el periodo contemplado entre 1995 y 2009. Se detectó toxoplasmosis cerebral en 42% de 320 pacientes.²⁴

Cabe mencionar el hallazgo reciente de alta prevalencia de anticuerpos de clase IgG anti-*T. gondii* (95.8%) en granjas de engorda en Yucatán, México,²⁵ lo que contrasta fuertemente con literatura de 25 años atrás, donde en cuatro estados del centro del país dichas prevalencias fueron del 8.9%.²⁶ Debe considerarse la falta de control de las poblaciones de gatos ferales (y la presencia de dueños irresponsables) y las deficiencias en las medidas de control en los sitios de consumo humano.²⁷

La infección congénita por *T. gondii* es la segunda en términos de frecuencia e importancia clínica en todo el mundo, después de la infección congénita por Citomegalovirus.^{28,29} A nivel mundial, la incidencia de la toxoplasmosis congénita varía desde 3/1000 a 1/10000 nacidos vivos según las diferentes series.^{2,22,28} En México existen pocos estudios. En 2005 se encontró una frecuencia de 2/1000 para toxoplasmosis congénita detectada en una población no sesgada de neonatos de la ciudad de México.³⁰ Como se mencionó, la toxoplasmosis en México puede estar aumentando (lo hizo entre 2000 y 2006);¹⁹ además, debe considerarse un número incierto de casos congénitos no detectados.

La transmisión congénita ocurre como resultado de la infección materna primaria durante la gestación (figura 3).³¹ La transmisión fetal en madres infectadas antes del embarazo es extremadamente rara, excepto en el caso de mujeres inmunocomprometidas crónicamente.³¹

Tradicionalmente, se ha descrito que la incidencia de la toxoplasmosis congénita depende de cuatro factores durante el embarazo: 1) la edad de la madre con infección primaria, 2) la distribución por edades de las mujeres embarazadas en la población, 3) la tasa de transmisión fetal en la infección primaria, y 4) el riesgo general de infección en esa localización geográfica.³¹ En general se cree que a mayor edad materna, la tasa de toxoplasmosis congénita será menor, ya que casi todas las mujeres embarazadas infectadas estarían en fase crónica, y por lo tanto con inmunidad concomitante a la presencia del parásito enquistado en los tejidos. La tasa global de transmisión de la madre al feto en mujeres que tienen seroconversión durante la gestación es del 25% al 30%, según un reporte muy conocido de una cohorte de Europa.³¹ La frecuencia y gravedad dependen principalmente del periodo del embarazo en la cual se infecta la madre. La tasa de transmisión vertical puede ser tan baja como del 6% a las 13 semanas de gestación, intermedia (40%) a las 26 semanas, y de 72% a las 36 (figura 4).³¹

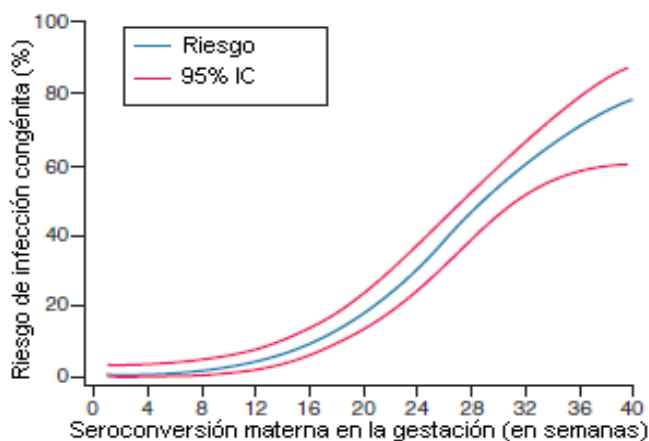


Figura 3. Riesgo de infección congénita según la semana de gestación de la seroconversión materna. Adaptado de Dunn et al, 1999.³¹

Por otro lado, el riesgo de que un feto infectado presente signos clínicos se ha estimado en 61% si la infección fue adquirida a las 13 semanas de gestación, 25% si se adquirió a las 26 semanas, y 9% si se adquirió a las 36 semanas (figura 4).^{22,31} Dado que la infección congénita es rara si la madre se infecta durante el embarazo temprano, el riesgo de que se presenten signos clínicos en el hijo puede estimarse multiplicando el porcentaje de riesgo de infección congénita (transmisión) que se muestra en la figura 3, por el porcentaje de riesgo de signos clínicos de la figura 4A, según la semana de gestación de la seroconversión materna y finalmente dividiendo el resultado entre 100; esto da la gráfica mostrada en la figura 4B.^{22,31} Por ejemplo, dado un 40% de riesgo de transmisión materno-infantil de la infección materna adquirida a las 26 semanas de gestación, y un riesgo del 25% de presentar signos clínicos, si se produce la transmisión, el riesgo general de presentar signos clínicos, cuando no se conoce el estado de infección del feto es del 10% ($40\% \times 25\%$ dividido entre 100). El máximo riesgo de dar a luz a un niño sintomático se considera entonces que es del 10% (8% a 14%), el cual se produce entre las 24 y las 30 semanas de gestación.³¹

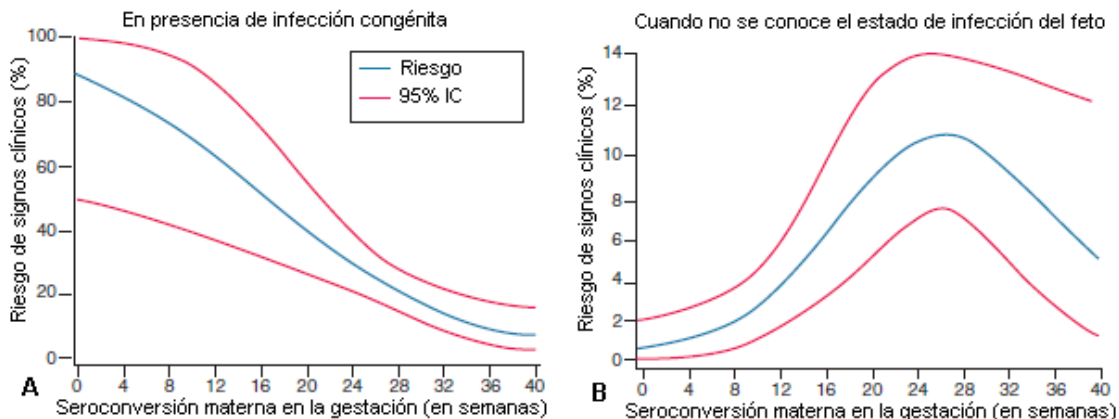


Figura 4. Riesgo de desarrollar signos clínicos antes de los 3 años de edad (no necesariamente sintomáticos al nacimiento), según la edad gestacional materna al momento de la seroconversión. Adaptado de Dunn et al, 1999.³¹

Virulencia del parásito

Toxoplasma gondii es una sola especie, y hace algunos años se había encontrado que la variabilidad genética era baja, por lo que se clasificaba en tres linajes principales, I, II y III, aunque se reportaban algunas cepas atípicas.³² En la actualidad se conocen casi 280 variantes genéticas, debidas en gran parte a las cepas aisladas en Sudamérica y otras regiones del mundo con climas más cálidos y húmedos que los de los países de Europa occidental y Estados Unidos, donde se obtuvieron los primeros aislamientos (figuras 5 y 6).³³ La relación entre la virulencia de las cepas y el cuadro clínico se puso de manifiesto con las cepas “atípicas”, muy abundantes en Brasil y Surinam, que se asocian a problemas

graves incluso en adultos inmunocompetentes.³⁴ Sin embargo, era controversial el papel de las cepas en cuanto a la generación de problemas clínicos en la infección congénita; por ello, se realizó una revisión sistemática con meta-análisis y se encontró que la relación del trimestre de gestación con la transmisión vertical y la severidad del cuadro clínico sólo es válida para las cepas tipo II y quizá para las tipo III (no virulentas en ratones), siendo las cepas tipo I y atípicas igualmente transmisibles y dañinas en cualquier trimestre (cuadro 1).^{12,35} En México, se demostró la presencia de infecciones tipo I o relacionadas a este linaje en unos cuantos casos de infección perinatal de la Ciudad de México.³⁶ Más recientemente se corroboró la preponderancia de las cepas tipo I, pero además, se demostró que cinco de nueve casos presentaron infección mixta, es decir, por más de una cepa de *T. gondii* (figura 7).¹² No se pudo dilucidar si las infecciones eran de una sola exposición o de exposiciones seriadas, por lo que no es posible determinar si la inmunidad concomitante sigue siendo el paradigma.

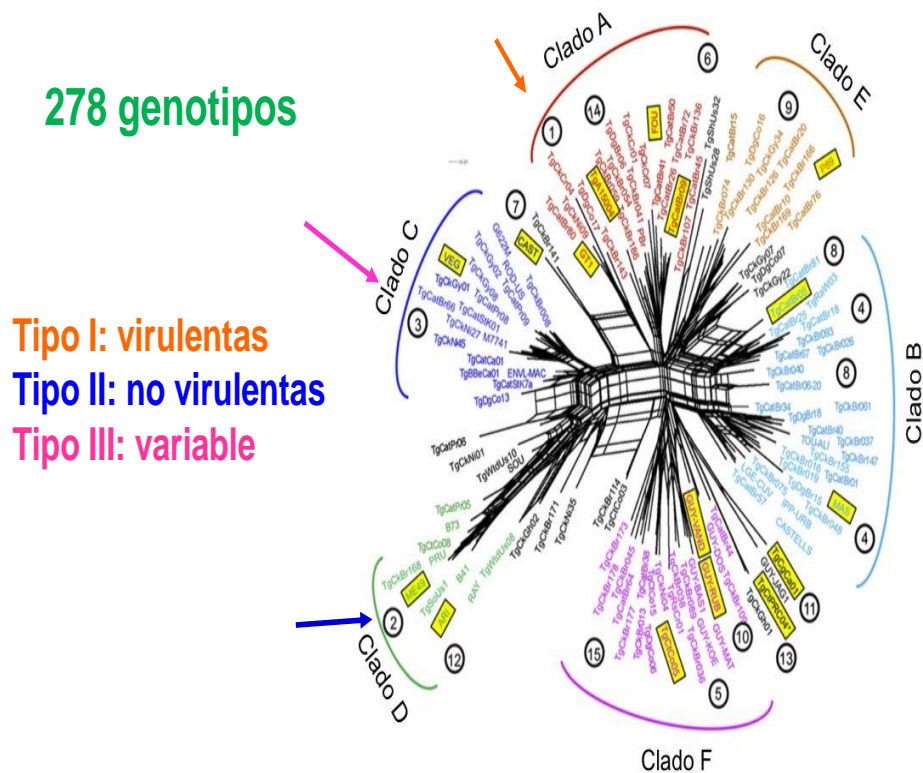


Figura 5. Variabilidad genética de *Toxoplasma gondii* en el mundo. La localización de las cepas clásicas I, II y III se marcan con flechas de sus colores respectivos en el dendrograma. Modificado de Su et al, 2012.³³

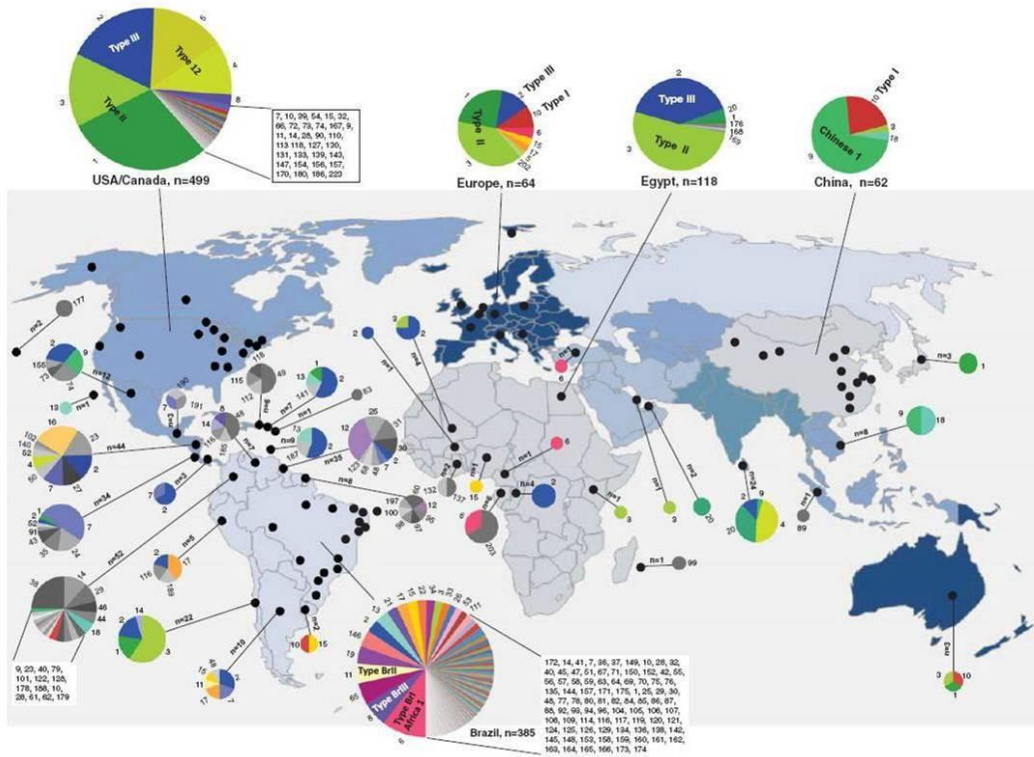


Figura 6. Variabilidad genética de *T. gondii* en el mundo. Puede observarse la gran diversidad de cepas en Brasil y Colombia en comparación con Estados Unidos y especialmente Europa occidental. Tomado de Su et al, 2012.³³

Cuadro 1. Relación entre el tiempo de infección materna o genotipo del parásito y desenlace clínico en neonatos con toxoplasmosis congénita

Variable	Total	Clinical problems		Odd ratio (CI _{95%})	P
		Number of cases	Percent		
Gestation weeks at infection					
<24	126	117	92.9	67.-9 (25.4-181.6)	< 0.0001
>24	56	9	16.1		
Parasite genotype					
I or atypical	69	60	86.9	2.47 (1.1-54.)	< 0.012
II or III	181	132	72.9		

Tomado de: Rico-Torres et al, 2016.³⁵

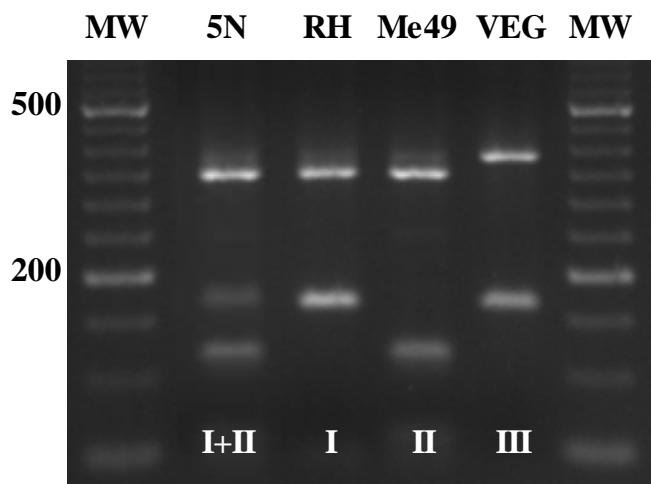


Figura 7. Infecciones mixtas (por más de una variante de *T. gondii*) en la toxoplasmosis perinatal en el valle de México. Se puede observar el patrón mixto en una sola muestra de un neonato (5N) en el carril (I+II) comparando con los parones de las cepas de referencia (RH, Me49 y VEG). Tomado de Rico-Torres et al, 2018.¹²

Respuesta Inmune

La infección por *T. gondii* induce respuesta inmunitaria humoral y celular, dando lugar a la destrucción de los taquizoitos extracelulares, pues sobreviven los parásitos situados dentro de los quistes tisulares. Una respuesta inmunitaria eficaz de tipo sistémico combinando mecanismos innatos y adaptativos, es responsable de la desaparición del parásito de la sangre periférica durante la infección aguda, de la reducción del número de taquizoitos en todos los tejidos y, tras los estados iniciales agudos, de la limitación de la carga parasitaria en otros órganos. Los taquizoitos se destruyen por los intermediarios reactivos del oxígeno, la acidificación, las fluctuaciones osmóticas, los intermediarios reactivos del nitrógeno, la depleción del triptófano intracelular y los anticuerpos específicos combinados con el complemento.¹¹

Dos semanas posteriores a la infección se pueden detectar anticuerpos IgG, IgM, IgA e IgE contra antígenos de *T. gondii* (figura 8). Los taquizoitos son lisados por el Complemento si son reconocidos por anticuerpos de las clases IgM, IgG1 o IgG3. Los anticuerpos de clase IgG2 e IgG4 pueden proteger por neutralización y la producción de anticuerpos IgA en las superficies mucosas parece proteger al hospedero contra reinfección.^{37,38} Los anticuerpos de clase IgE rara vez se producen, pero cuando están presentes se asocian a problemas clínicos, en ocasiones graves.³⁸

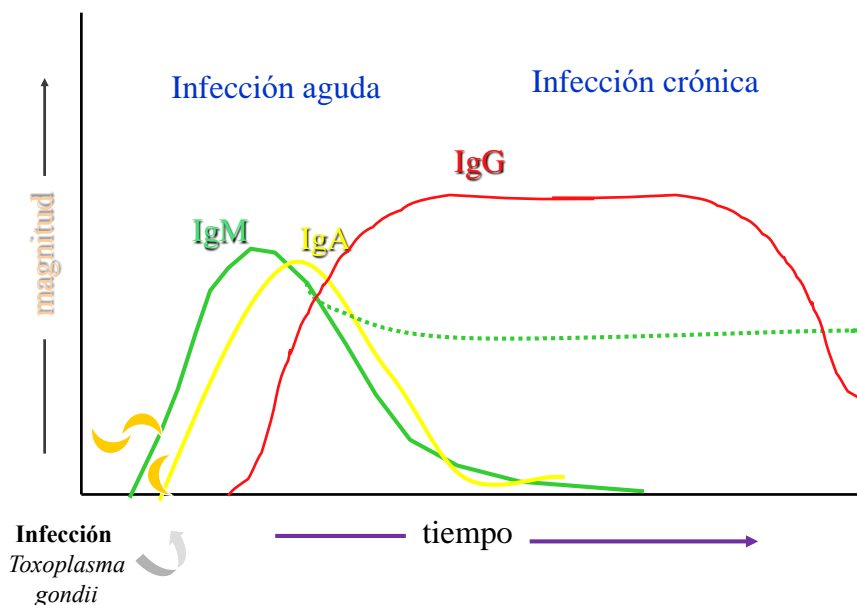


Figura 8. Respuesta de anticuerpos en la infección adquirida primaria.

Posiblemente los astrocitos y la microglia desempeñen papeles importantes en la respuesta inmunitaria frente a *T. gondii* en el sistema nervioso central (SNC). En los estadios precoces se produce una astrocitosis importante y diseminada en las regiones en las que se detecta el parásito. Aunque *T. gondii* puede invadir, sobrevivir y multiplicarse dentro de los astrocitos, es destruido por la microglia activada.^{11,39}

En la toxoplasmosis adquirida, tanto la respuesta innata como la adaptativa juegan un papel primordial en la protección contra el daño, no así contra la infección.^{40,41} La primera es mediada principalmente por macrófagos/monocitos, células dendríticas (DCs) y células asesinas naturales (NKs), que pueden reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de receptores particulares, entre ellos los TLRs; éstos inducen la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-1, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como de la IL-12 y la IL-10 por macrófagos y células dendríticas; algunos estudios tempranos sugerían que los neutrófilos eran importantes en la respuesta temprana, pero estudios más recientes sugieren que no es así, y que de hecho contribuyen a la patogenia.¹¹ Es importante la presentación de antígenos a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II y, por lo tanto, la inducción de la respuesta inmune adaptativa, la cual, si es de perfil adecuado, protege contra una reinfección (figura 9).⁴⁰ Los NLR (receptores de tipo dominio de oligomerización de nucleótidos [NOD]), que son una rama del sistema inmune innato, detectan signos o patrones moleculares específicos de varios patógenos. La susceptibilidad a la infección por *Toxoplasma* en humanos se asocia a un polimorfismo en un NLR humano llamado NALP1 (NACHT-LRR-PYD proteína contenedora de dominios-1).¹¹

En la fase aguda se induce una respuesta adaptativa Th1, durante la cual se producen altos niveles de IL-2, IL-12, IFN- γ y TNF- α . Estas citocinas combinadas activan, entre otros, a los macrófagos, a los linfocitos CD8+ y a las células NK, así como la producción de

anticuerpos de la clase IgG1 e IgG3, los cuales fijan complemento y promueven la inflamación, lo que a su vez resulta fundamental para el control de la infección por *T. gondii*. Al funcionar como opsoninas, estos anticuerpos también potencian la actividad fagocítica y la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) por macrófagos y células NK, respectivamente, a través de los receptores Fc- γ RI y Fc- γ RIII, eliminando al parásito o a las células infectadas. Así, protege al hospedero contra la rápida replicación de taquizoítos y los cambios patológicos subsecuentes.

La expansión de las células NK y de los linfocitos T $\gamma\delta$ en las fases iniciales de la infección, proporciona una resistencia innata mientras que se desarrolla la respuesta adaptativa mediada por linfocitos T CD4 y CD8 $\alpha\beta$. Estas distintas subpoblaciones de linfocitos T y células NK posiblemente protegen al huésped mediante la secreción de IFN, IL-2 y TNF- α , mientras que no parecen lisar las células infectadas por *T. gondii*. El IFN- γ derivado de las células NK es crucial en la diferenciación de las células dendríticas productoras de IL-12. Las moléculas coestimuladoras CD28 y ligando de CD40 resultan fundamentales para la regulación de la producción de IL-12 e IFN- γ en respuesta al parásito.¹¹

Después de la invasión de enterocitos, *T. gondii* infecta las células presentadoras de antígeno en la lámina propia intestinal e induce una respuesta Th1 transitoria. La infección por *T. gondii* de las células presentadoras de antígeno, como las dendríticas y los macrófagos, condiciona una regulación al alza de los contrarreceptores para CD28 y CD40L, CD80/CD86 y CD40. La unión de CD80/CD86 a CD28 estimula la producción de IFN- γ por los linfocitos T CD4+. Además, la unión de CD40L a CD40 estimula la secreción de IL-12, lo que a su vez estimula la producción de IFN- γ . La importancia de CD40L en la respuesta inmunitaria frente a *T. gondii* se confirma por publicaciones de toxoplasmosis diseminada en niños con defectos congénitos en la transmisión de señales a través de CD40L (síndrome hiper-IgM). Además, algunos estudios recientes han demostrado que la expresión de CD40L es deficiente en los linfocitos T CD4+ de los pacientes infectados por VIH. Puede ser que esta deficiencia esté implicada en una producción alterada de IL-12/IFN- γ observada en la infección por VIH.¹¹

Las células dendríticas, por su habilidad de producir IL-12, son las principales activadoras de la respuesta inmune Th1. Los granulocitos también pueden contribuir a la producción temprana de IL-12. Esta citocina favorece la supervivencia durante la infección por *T. gondii* estimulando la producción de IFN- γ por las células NK; se cree que también regula la expresión de esta última citocina por los linfocitos T. El IFN- γ , a su vez, tiene un papel importante en la prevención del desarrollo de la enfermedad. Además, las diferencias de las concentraciones de IL-12 observadas durante la infección por las distintas cepas del parásito pueden ser responsables de algunas diferencias en su virulencia. Parece que estas diferencias guardan relación con la activación (fosforilación) del factor de transcripción STAT3, que a su vez depende del alelo de la proteína de las roptrias denominada ROP16.¹¹

El TNF- α es otra citocina clave para controlar la infección por *T. gondii*. Esta molécula es necesaria para desencadenar la activación de los macrófagos mediada por IFN- γ para la actividad destructiva de *T. gondii* y para la producción de óxido nítrico (un inhibidor de la replicación de *T. gondii*) por los macrófagos.¹¹

Se ha demostrado que la IL-10 regula a los macrófagos y reduce la destrucción de *T. gondii* *in vitro*. La IL-4, que suele considerarse citocina capaz de regulación a la baja, es importante para la resistencia frente al desarrollo de enfermedad. También se ha demostrado que la IL-7 tiene un efecto protector frente a *T. gondii*. Durante las fases precoces de la infección, la IL-12, la IL-1 y el TNF- α actúan de forma coordinada con la IL-15 para estimular la producción de IFN- γ por las células NK.^{42,43} Por su parte, IL-17 es proinflamatoria y la IL-23 la regula.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la implicación del IFN- γ en la resistencia del huésped frente a *T. gondii*. La participación de los productos intermedios del nitrógeno reactivos (incluido el ON) se sugiere por la observación de que acetato de L-NG-monometil-arginina (L-NMMA), un análogo competitivo de L-arginina, inhibe de forma simultánea la síntesis de ON y la destrucción de los taquizoitos intracelulares por los macrófagos peritoneales activados por citocinas y las células de la microglia. Parece que el papel protector del ON es específico para cada tejido, más que sistémico.⁴⁴⁻⁴⁷

Las GTPasas p47 inducibles por IFN- γ , IRGM3 (IGTP) e IRGM1 (LRG47) parecen fundamentales para el control de la infección por *T. gondii* y algunos estudios recientes han vinculado IRGM3 con la destrucción autofágica de las vacuolas que contienen *Toxoplasma* en los macrófagos activados por IFN- γ .¹¹

Los macrófagos activados inhiben o matan al *T. gondii* intracelular. Sin embargo, el parásito puede contrarrestar parcialmente estas acciones aún en estadios tempranos de la infección. *Toxoplasma gondii* puede explotar células presentadoras de antígeno, también llamadas “Caballos de Troya”, mediante la regulación negativa de moléculas de superficie celular e interferencia con las vías de apoptosis. Los linfocitos CD4+ y CD8+ son citotóxicos para las células infectadas por *T. gondii*. Existe una interrelación entre los linfocitos T CD4+ y CD8+ tanto para la inducción de la resistencia como para el mantenimiento de la latencia.¹¹ Las citocinas proinflamatorias (IFN- γ y TNF- α) y las regulatorias (IL-10, TGF- β) están involucradas en el balance de esta respuesta.¹⁴ Así, una vez controlada la replicación parasitaria, este perfil Th1 debe ser regulado por citocinas regulatorias, especialmente IL-10 y TGF- β , ya que una respuesta tipo Th1 no regulada o prolongada (sin Treg, es decir, sin IL-10 y TGF- β), puede provocar una reacción inflamatoria que cause daño grave. De hecho, se ha encontrado que existe una regulación a la alta de IFN- γ y TNF- α a >2200 pg/ml y >300 pg/ml, respectivamente, durante los estadios tempranos de infección intraocular ($p < 0.01$), pero los niveles caen drásticamente a normales durante los estadios tardíos de la infección en el día 26.⁴⁸ Subsecuentemente, la respuesta regulatoria sigue induciendo la producción de los anticuerpos IgG1 e IgG3, lo que, paralelamente al disminuir la inflamación, prolonga la protección mediada por anticuerpos.

Por ende, una respuesta “adecuada” contra *T. gondii* debe iniciar con un perfil Th1 pero debe ser regulada por citocinas tipo IL-10 y TGF- β , lo que da como fenotipo una respuesta “regulada”.

Si la respuesta inicia en un microambiente Th2, esto es IL-5 e IL-13, se inhibe la producción de IFN- γ y por ende, de los mecanismos efectores, provocando que no haya

control de la proliferación parasitaria y produciendo como consecuencia un daño considerable (figura 9).^{41,49} Los anticuerpos IgG4 inhiben la fijación del complemento por otras subclases y, al igual que los de clase IgE, son promovidos por la IL-4, por lo que se asocian a un perfil Th2.^{50,51} La IgG2 es promovida por IL-2, pero aumentada por IL-6. Este perfil también provoca inflamación, por lo que se considera en el presente proyecto como “respuesta Th2”.³⁸ Sin embargo, algunos estudios en modelos animales han mostrado que las ratonas preñadas que no tienen el gen para la IL-4 (KO-IL-4) tienen menor susceptibilidad a infección por *T. gondii*.⁵⁰

En seres humanos se sabe muy poco de la relación entre las clases/subclases de anticuerpos y la protección o daño, pero los datos existentes son congruentes con una aparición de la IgG1 en la fase aguda, relacionada al fenotipo Th1 protector en individuos inmunocompetentes (respuesta Th1 regulada) y una relación de la IgE con el perfil Th2 (IL-4, IL-5 o IL-13) y con problemas clínicos (fenotipo Th2).^{38,51}

En resumen, la respuesta regulada (y protectora contra enfermedad) es Th1, seguida de Treg, y las respuestas no reguladas son Th1 sin regulación Treg y la respuesta Th2; ambas ocasionan inflamación y daño tisular, en ocasiones grave; la segunda además, no detiene la proliferación de los taquizoitos del parásito.

Un aspecto relevante en el contexto de esta tesis, es que hasta hace poco se creía que la inmunidad en los huéspedes inmunocompetentes duraba toda la vida y que la reinfección exógena no parecía producir repercusión clínica, aunque en un caso publicado, una mujer embarazada con infección crónica presentó afectación del feto tras la infección con una cepa virulenta.¹¹ Como se mostró en la sección anterior, nuestros datos también sugieren que hay infecciones dobles en algunos niños con la forma congénita y otros con infección única cuyas madres tenían dos; aunque no se puede descartar que provengan de una sola infección materna con dos cepas, podría también sugerir que infecciones subsecuentes puedan causar infección en la madre y el feto.¹²

Cuadro clínico de la toxoplasmosis congénita

Como se mencionó anteriormente, el daño clínico en la toxoplasmosis congénita depende del tercio de la gestación en que se infecta el producto, siendo más grave cuando la infección se presenta en el primer trimestre del embarazo. El sistema ventricular es el más afectado en el neonato. La obstrucción inflamatoria causa hidrocefalia de los ventrículos tercero y lateral con necrosis y vasculitis. El incremento en la presión intracerebral puede producir destrucción hipotalámica. Las áreas necróticas, ocasionadas en gran medida por la desintegración de los quistes, usualmente se calcifican.

La patología grave manifiesta se presenta como:

- Aborto, prematuridad, óbito.
- Infección generalizada, con hepatoesplenomegalia y compromiso de diversos órganos: neumonía intersticial, miocarditis.
- Las lesiones en SNC y ojo, incluyendo hidrocefalia, microcefalia, convulsiones, retraso psicomotor, retinoroiditis, estrabismo, ceguera e hipoacusia.

- La triada clínica asociada, poco frecuente, que incluye hidrocefalia, retinocoroiditis y calcificaciones cerebrales intraparenquimatosas, que fue descrita por primera vez en 1942 por Sabin. Desde entonces, se han descrito un gran número de manifestaciones clínicas (cuadro 2), algunas de las cuales ya se comentaron.⁵²⁻⁵⁴ El riesgo de lesiones oculares y calcificaciones cerebrales intraparenquimatosas en los pacientes con toxoplasmosis varía, puesto que en Europa es del 14% y 9% respectivamente, mientras que en Sudamérica es del 47% y 53%.

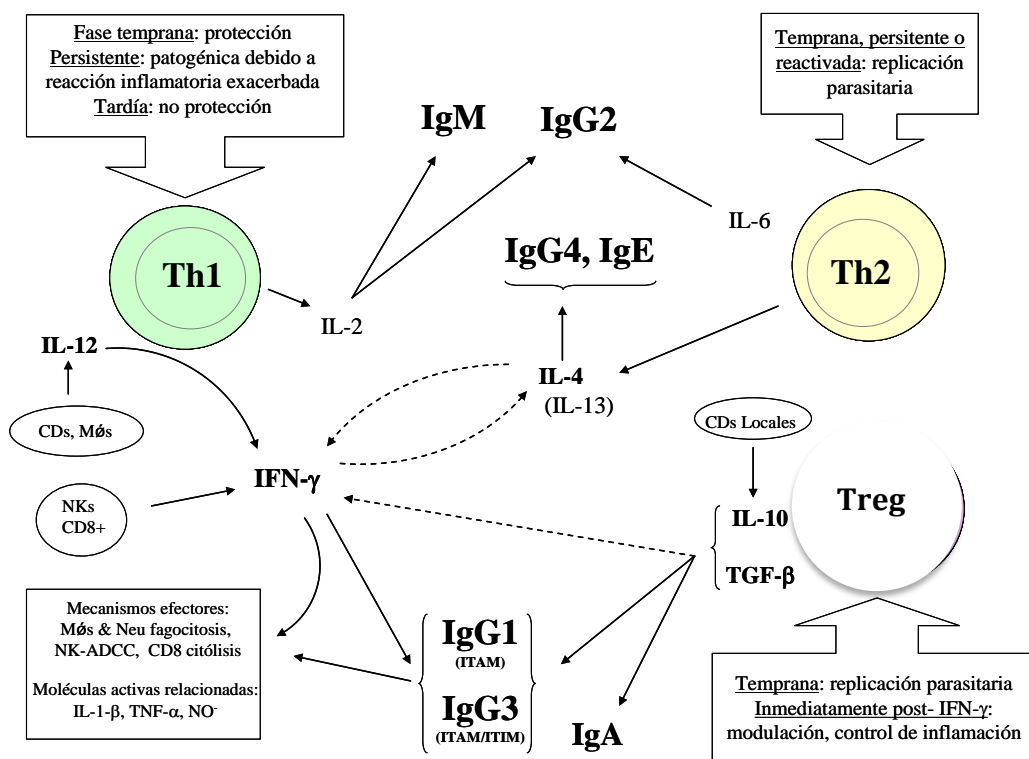


Figura 9. Representación esquemática de los fenómenos inmunológicos principales durante la toxoplasmosis adquirida y del cambio de clases subclases en seres humanos. ADCC: citotoxicidad celular mediada por anticuerpos; CDs: células dendríticas; ITAM: señal intracelular de activación en macrófagos y células NK; ITIM: señal intracelular de regulación en células B; Mós: macrófagos; Neu: neutrófilos; NK: células asesinas naturales. Las líneas continuas y punteadas representan regulación positiva y negativa, respectivamente. Tomado de Correa et al, 2007.³⁸

Como se mencionó, los neonatos infectados durante el tercer trimestre nacen por lo general sin signología evidente. Cuando presentan manifestaciones, pueden parecer normales al nacimiento y desarrollar la sintomatología semanas o meses después, generalmente secundarias al compromiso ocular: retinocoroiditis (presentando estrabismo o nistagmo), la cual puede ocasionar ceguera, o afectación del SNC, principalmente hidrocefalia, la cual

origina convulsiones, fontanela abombada y aumento del perímetro cefálico. La retinocoroiditis puede manifestarse en la edad escolar, y se ha documentado hasta los 22 años en el seguimiento de una cohorte de pacientes con infección congénita.¹⁶ En algunas ocasiones, la hidrocefalia aparece en niños en edad escolar, secundaria a estenosis del acueducto de Silvio.^{38,40,52} Varias de las secuelas de la toxoplasmosis congénita se presentan a largo plazo, en la infancia, adolescencia, y en jóvenes adultos.

En los casos que nacen con signos aparentes, generalmente infectados a la mitad del embarazo, hay una amplia gama de lesiones que van desde una ligera disminución hasta pérdida total de la audición o la visión; convulsiones secundarias a calcificaciones intraparenquimatosas e incluso hidrocefalia, microcefalia o anencefalia, que son las lesiones más dramáticas. En una infección diseminada, se pueden desarrollar procesos neumónicos intersticiales, hepatitis y miocarditis, así como malformaciones internas y externas.^{38,40}

Cuadro 2. Signos en 210 lactantes con infección congénita por *T. gondii*

Hallazgos	n examinados	n positivos (%)
Prematurez	210	
Peso al nacer <2500 g		8 (3.8)
Peso al nacer 2500 a 3000 g		5 (7.1)
Retraso del crecimiento intrauterino	201	13 (6.2)
Ictericia	210	20 (10)
Hepatoesplenomegalia	210	9 (4.2)
Púrpura trombocitopénica	210	3 (1.4)
Anomalías en el recuento sanguíneo (anemia, eosinofilia)	102	9 (4.4)
Microcefalia	210	11 (5.2)
Hidrocefalia	210	8 (3.8)
Hipotonía	210	12 (5.7)
Convulsiones	210	8 (3.8)
Retraso psicomotor	210	11 (5.2)
Calcificaciones en la radiografía	210	24 (11.4)
Intracraneal		
En la ecografía	49	5 (10.0)
En la tomografía computada	13	11 (84.0)
Electroencefalograma anómalo	191	16 (8.3)
Líquido cefalorraquídeo anómalo	163	56 (34.2)
Microftalmia	210	6 (2.8)
Estrabismo	210	111 (5.2)
Retino-coroiditis	210	
Unilateral		34 (16.1)
Bilateral		12 (5.7)

Tomado de Couvreur et al, 1984.⁵⁵

Diagnóstico

Para comprender los métodos diagnósticos para infección por *T. gondii*, conviene recordar lo siguiente: la IgG aparece entre la primera a segunda semana post-infección, pero también se transmite por vía transplacentaria. Para diferenciar la IgG transmitida de la madre al hijo de la sintetizada por el hijo, se emplea la técnica de western blot con el suero del paciente y de la madre de manera simultánea, donde se observan neoanticuerpos cuando existen bandas antigénicas reconocidas por los anticuerpos IgG del hijo. En cambio, la IgM se hace positiva en la primera semana postinfección y su presencia en el neonato es diagnóstica, pues no atraviesa la barrera placentaria; si hay anticuerpos de clase IgA también son confirmatorios, pero se presentan en un número menor de casos. No obstante, se han descrito falsos positivos por contaminación con sangre de la madre, por el proceso de la extracción de la sangre del cordón o por falta de especificidad de la técnica.⁵³

Por otro lado, se ha observado ausencia de IgM en un 25-30% de los pacientes infectados debido a la inmadurez del sistema inmunitario o a baja sensibilidad de la técnica, o bien porque la infección ocurre en etapas tempranas del embarazo y los anticuerpos ya decayeron al nacimiento.

Finalmente, la PCR en punto final o en tiempo real permite demostrar la presencia del parásito en circulación y la cuantificación de la carga parasitaria, respectivamente. Una carga elevada se relaciona con la infección. Ésta se puede realizar como complemento del estudio serológico del paciente con sospecha de infección cuando no se detecta IgM específica.^{2,13,22,23,37,52} Cabe resaltar que el valor predictivo negativo de la PCR es bajo, ya que sólo un 20-40% de los casos tienen DNA parasitario en sangre; por ello los resultados negativos de PCR no son de ayuda para descartar la toxoplasmosis.

Cabe mencionar que los anticuerpos de avidez baja en la madre apoyan que la infección se adquirió en un periodo no mayor a 12 semanas, mientras que, entre mayor sea la avidez, es más probable que la infección haya ocurrido con anterioridad a este periodo. Por lo anterior, la probabilidad de infección fetal en el último trimestre es alta, y debido al riesgo mayor de infección fetal en este periodo, una avidez baja hace sospechar de infección congénita. Por ende, ante una avidez baja y negatividad de cualquier otra prueba clínica o confirmatoria, conviene seguimiento estrecho del neonato y en última instancia tratamiento profiláctico.^{2,13,22,23,37,52}

Existen tres escenarios de toxoplasmosis congénita confirmada: los sintomáticos con IgM positiva, sintomáticos con IgM negativa pero con historia de toxoplasmosis gestacional o PCR positiva, o los asintomáticos con historia de toxoplasmosis gestacional e IgM o PCR positivas. Existe duda del diagnóstico cuando se refieren antecedentes de toxoplasmosis gestacional pero el hijo se encuentra asintomático y con IgM y PCR negativas. En este caso se recomienda, si la infección fue en el segundo trimestre, dar seguimiento con IgG sin iniciar tratamiento; si fue en el tercer trimestre, iniciar tratamiento además del seguimiento con IgG, que de continuar positivo se continúa el tratamiento. También el diagnóstico de toxoplasmosis congénita es dudoso cuando el antecedente de infección gestacional es dudoso o ausente pero el paciente presenta manifestaciones características con IgM y PCR negativas. Aquí se recomienda descartar también infección por citomegalovirus y rubeola y, en ese caso, iniciar tratamiento y dar seguimiento con IgG.^{2,13,22,23,37,52}

Así pues, el diagnóstico de toxoplasmosis congénita no es fácil ya que existe positividad variable entre las pruebas diagnósticas para un mismo individuo. Por ejemplo, puede

presentar IgG e IgM positivo pero PCR negativo, lo que se explicaría por la naturaleza intracelular del parásito y que no necesariamente se encuentra circulando en el torrente sanguíneo. Otro ejemplo es el paciente que presenta únicamente títulos de IgG más elevados que los de la madre o un incremento en los títulos de IgG a través del tiempo, lo cual por sí solo hace sospechar fuertemente de infección congénita. Es por ello importante combinar distintos métodos para una adecuada evaluación diagnóstica (el análisis simultáneo de los tres tipos de pruebas permite incrementar la sensibilidad) o en algunos casos solicitar nuevos títulos de IgG tres semanas después para confirmar o descartar la infección.^{2,13,22,23,37,52}

Tratamiento

El tratamiento de la infección por *T. gondii* es una de las áreas de mayor problema científico y médico, pues la infección sólo puede ser controlada médicamente durante la etapa aguda, ya que los bradizoitos contenidos en los quistes tisulares de la fase crónica son de difícil acceso a las drogas, y por ende, no se ha descrito tratamiento químico o inmunológico alguno que erradique la infección: la terapéutica específica actúa principalmente contra la forma de taquizoito.²³ El tratamiento necesario y su duración se determinan por la naturaleza y la gravedad de la enfermedad y por el estado inmune del paciente infectado.^{53,54} Los fármacos utilizados interfieren con la replicación del parásito, pero también afectan la hematopoyesis, por lo que deben acompañarse de ácido fólico, además, suelen ser prolongados y tienen efectos colaterales. La gama de medicamentos disponibles no es amplia, pues prácticamente se restringen a la combinación de pirimetamina y sulfadiazina (o clindamicina si no hay tolerancia a la sulfadiazina).^{53,54} La dosis depende del objetivo del tratamiento, preventivo o curativo y, en este caso, del órgano blanco y el grado de lesión.²³

Pirimetamina

La pirimetamina ha demostrado ser eficaz contra *T. gondii*. Cuando se utiliza junto con sulfadiazina, se obtiene un efecto sinérgico.^{53,54} La terapia combinada está indicada para la mayoría de las formas de toxoplasmosis. Inhibe la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), y por lo tanto la síntesis del ácido fólico, útil para la síntesis de bases púricas y pirimidínicas.⁵⁴ Sus efectos adversos incluyen: hiporexia, náuseas, vómito, depresión reversible de la médula ósea (siendo la neutropenia la más común), anemia megaloblástica, glositis atrófica y alergia.⁵⁶ Otros efectos tóxicos también descritos son: anemia aplásica, hepatotoxicidad y síndrome de Stevens-Johnson.⁵⁷

A todos los pacientes tratados con pirimetamina se les debe hacer una biometría hemática dos veces por semana. Se pueden presentar convulsiones con la sobredosis de pirimetamina.² Siempre se debe administrar conjuntamente con ácido fólico para evitar la depresión medular, ya que las células humanas pueden utilizarlo para la síntesis de ácidos nucleicos, lo cual no sucede en el caso de *T. gondii*.⁵⁷

Sulfadiazina

Antibiótico derivado de sulfonamida, inhibe la síntesis de ácido fólico mediante antagonismo competitivo con el ácido para-aminobenzoico. Tiene actividad contra *T.*

gondii, haciendo sinergismo con la pirimetamina.⁵⁸ Puede causar litiasis renal. El riesgo de desarrollar litiasis en estos pacientes puede reducirse con la administración de una mayor cantidad de líquidos (de 1 a 2 litros por arriba de los líquidos de mantenimiento) y la alcalinización urinaria.⁵⁷ Otros efectos tóxicos de la sulfadiazina incluyen náuseas, vómito, dolor abdominal, reacciones de hipersensibilidad, por ejemplo, el síndrome de Stevens-Johnson y el síndrome de DRESS (síndrome de erupción cutánea con eosinofilia y síntomas sistémicos), supresión de la médula ósea, y hepatotoxicidad.^{2,57}

Trimetoprim con sulfametoxazol

Debido a que la actividad del sulfametoxazol es menor que la de sulfadiazina, el trimetoprim-sulfametoxazol ha sido considerado menos eficaz como tratamiento para la toxoplasmosis. Sin embargo, dado que en México no se encuentra disponible la sulfadiazina, se emplea en su lugar este antibiótico. El sulfametoxazol inhibe la síntesis de ácido dihidrofólico a partir del ácido para-aminobenzoico interfiriendo con la síntesis de ácido fólico.⁵⁸ El trimetoprim bloquea la dihidrofolato reductasa e impide la reducción del ácido dihidrofólico hasta ácido tetrahidrofólico; lo anterior inhibe la formación de folatos y por consecuencia la síntesis de proteínas, causando lisis del microorganismo.⁵⁶ Los efectos adversos se deben en su mayoría al sulfametoxazol y son náuseas, diarrea, y menos comunes el eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica, hematuria, proteinuria, neuritis periférica, alucinaciones y en el 5% de las veces se presenta pancitopenia y aplasia medular.⁵⁶

Pronóstico

La instauración temprana de un tratamiento específico para los pacientes con toxoplasmosis congénita por lo general cura las manifestaciones activas, incluyendo la retinocoroiditis, la meningitis, la encefalitis, la hepatitis, la esplenomegalia y la trombocitopenia, las cuales se resuelven algunas semanas después del inicio del tratamiento y no se ha documentado una disminución significativa de la función cognitiva ni auditiva. Sólo un pequeño porcentaje de niños con daño neurológico grave e irreversible por hidrocefalia, hiperproteinorraquia importante y retraso en la colocación de un sistema de derivación, ha manifestado un retraso psicomotor profundo y crisis convulsivas. En la mayoría de los pacientes, existe un repunte de títulos serológicos de anticuerpos contra *T. gondii* 3 a 4 meses después de la suspensión del tratamiento.^{2,57}

Los niños con una amplia afectación al nacimiento pueden tener un desarrollo normal a futuro o presentar alteraciones leves a moderadas de la visión, audición, función cognitiva, y otras funciones neurológicas. Por otro lado, algunos niños con infección subclínica presentan alteraciones intelectuales a pesar del tratamiento con pirimetamina y sulfadiazina.

La aparición de lesiones oculares en los primeros años de vida puede prevenirse usando tratamiento antimicrobiano con pirimetamina y sulfonamidas. Además, el tratamiento durante el primer año de vida se asocia con una menor frecuencia de pérdida auditiva. El retraso en el diagnóstico y tratamiento, la hipoglucemia perinatal, la hipoxia, la hipotensión, las infecciones repetidas de la derivación y la discapacidad visual grave, se asocian con un

peor pronóstico. El pronóstico es reservado, pero no es necesariamente malo para los pacientes infectados.²

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La patogenia en un paciente con toxoplasmosis congénita puede deberse a factores del hospedero (feto) una vez que ocurrió la infección; el único estudio que ha analizado esto directamente en población caucásica mostró que el alelo DQ3 del HLA se asocia con desarrollo de hidrocefalia. Por otro lado, si un feto se infecta hacia el final del embarazo con cepas de tipo II, tiene una probabilidad cercana al 80% de nacer sin problemas clínicos aparentes, lo cual es congruente con su mayor capacidad de respuesta inmune, aunque posteriormente puede desarrollar secuelas. Algunos pacientes nacen con signología sistémica; si bien esto puede deberse a infecciones por tipos más virulentos de *T. gondii*, (tipo I o atípicas), el perfil de respuesta inmune que presentan algunos de estos pacientes puede jugar un papel preponderante.^{35,40,41}

Por lo anterior, se puede concluir que hay controversia e información escasa con respecto al papel de la respuesta inmune del neonato infectado congénitamente por *T. gondii* en relación a la presencia de manifestaciones clínicas, su gravedad y su localización.

JUSTIFICACIÓN

Se conoce poco acerca de la relación entre la respuesta inmune y el perfil clínico del paciente con toxoplasmosis congénita. Con los resultados de este proyecto de investigación translacional, en el que se buscó encontrar esta relación entre el perfil de la respuesta inmune (Th1 regulada vs Th1 no regulada o Th2) y el perfil clínico del paciente con toxoplasmosis congénita (presencia de manifestaciones clínicas localizadas/neurológicas vs diseminadas, y leves vs moderadas/graves), pueden buscarse marcadores pronósticos a futuro en los pacientes infectados por este protozooario, que permitan predecir el riesgo de desarrollar manifestaciones clínicas durante el primer año de vida, y con ello dar un seguimiento más estrecho a los pacientes que presenten un perfil inmune de riesgo clínico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre el perfil de respuesta inmune del paciente con toxoplasmosis congénita (Th1 regulada vs Th1 no regulada o Th2) y el perfil clínico (presencia de manifestaciones clínicas localizadas/neurológicas vs diseminadas o cuadro clínico leve vs moderado/grave) durante su primer año de vida.

HIPÓTESIS

El perfil inmune Th1 regulado se relaciona con manifestaciones clínicas localizadas/neurológicas en pacientes con toxoplasmosis congénita, mientras que el perfil inmune Th1 no regulado y el perfil inmune Th2 se relacionan con manifestaciones clínicas diseminadas o cuadro moderado/grave.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio

Seguimiento de una cohorte (descriptivo, longitudinal)

Población objetivo

Pacientes con infección congénita por *Toxoplasma gondii* confirmada

Población elegible

Pacientes con diagnóstico de infección congénita por *Toxoplasma gondii* que acudieron al Instituto Nacional de Pediatría referidos por cualquiera de las siguientes centros:

-Centro de Salud “Dr. Gustavo A. Roviroso”

-Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

-Instituto Nacional de Perinatología durante marzo 2014 a febrero 2016, detectados prenatalmente, al nacimiento o durante los primeros 7 días de vida.

Criterios de selección

Cohorte: Pacientes con infección congénita por *Toxoplasma gondii* diagnosticados prenatalmente, al nacimiento o durante los primeros 7 días de vida.

Criterios de inclusión: Se incluyeron pacientes con infección congénita por *T. gondii*, detectados por tamiz prenatal, postnatal o hallazgos clínicos y de laboratorio confirmatorios, que contaron con perfil inmunológico realizado durante los primeros 7 días y cuyas madres aceptaron el estudio mediante consentimiento informado.

Criterios de exclusión: Se excluyeron pacientes infectados a quienes no fue posible realizar perfil inmunológico durante los primeros 7 días de vida.

Criterios de eliminación: No se eliminaron pacientes, ya que no hubo pacientes que dejaran de acudir a revisión, que decidieran salir del estudio, que suspendieran tratamiento o en quienes se hubiera encontrado alguna inmunodeficiencia.

Estrategia general

En las figuras 10 a la 14 se muestran los esquemas para el diagnóstico de la infección congénita y para la determinación del perfil inmune.

Diagnóstico de infección congénita. Algunos pacientes fueron detectados como sospechosos *in utero* a través de serología a madres del INPer o del Centro de Salud “Dr. Gustavo A. Roviroso” (tamiz prenatal). Se diagnosticaron por tamiz postnatal (provenientes del Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez) o bien porque llegaron al INP por manifestaciones clínicas. Al nacimiento se tomó sangre periférica o de cordón umbilical para diagnosticar infección fetal por pruebas serológicas (IgM, IgA y neoanticuerpos IgG

por western blot), bioensayo en ratón y PCR en tiempo real (qPCR). En caso de diagnóstico de infección congénita, se prescribió tratamiento durante un año al niño y seguimiento clínico, de acuerdo con lo recomendado internacionalmente.

Estudio de perfil de respuesta inmune. De sangre periférica o del cordón umbilical se extrajeron las células mononucleares periféricas para realizar ensayos de estimulación con antígenos de *T. gondii*, para determinar el perfil de la respuesta inmune, por medio de citometría de flujo (proliferación de linfocitos y perfil de citocinas) y ELISA indirecto para todas las clases y subclases de anticuerpos anti-*T. gondii*.

Evaluación clínica. Oftalmológica, audiológica, neurológica e infectológica de los pacientes, buscando los signos característicos de las formas graves y cualquier indicio de secuela. A todos los casos se les examinó durante un año.

Se buscó la relación entre el perfil de respuesta inmune y el perfil clínico.

Muestras y estrategia experimental

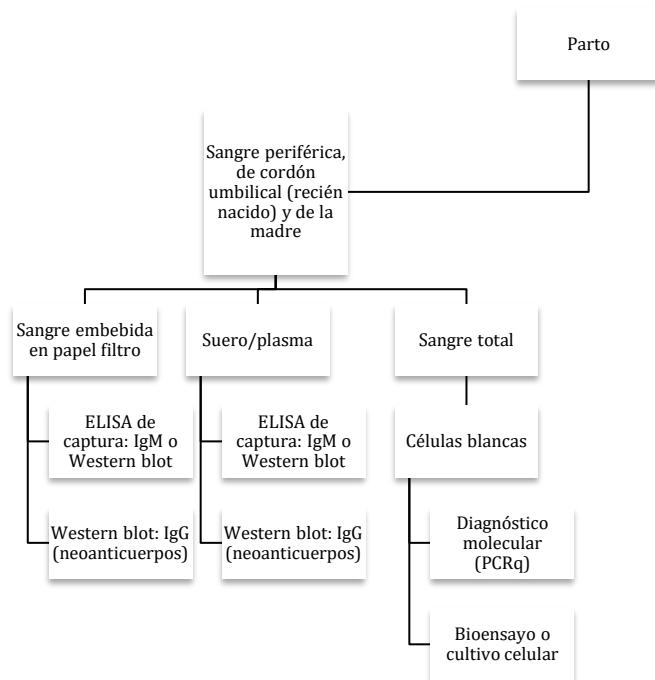


Figura 10. Estrategia del estudio donde se inserta este protocolo. Se ejemplifica la realización de tamiz postnatal.

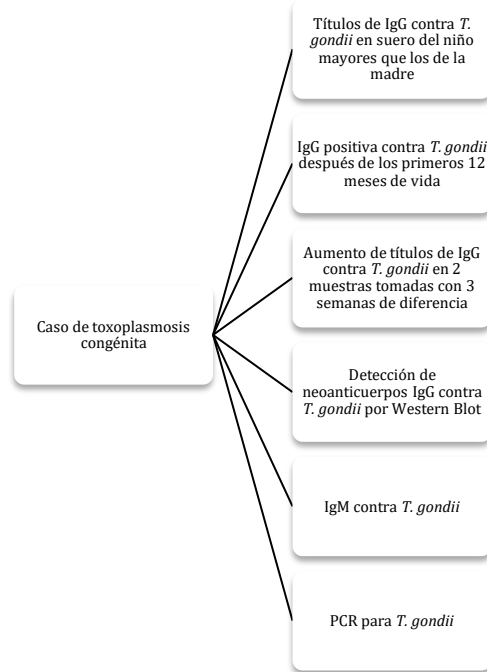


Figura 11. Diagrama de las pruebas que se realizaron para confirmar el diagnóstico de toxoplasmosis congénita.

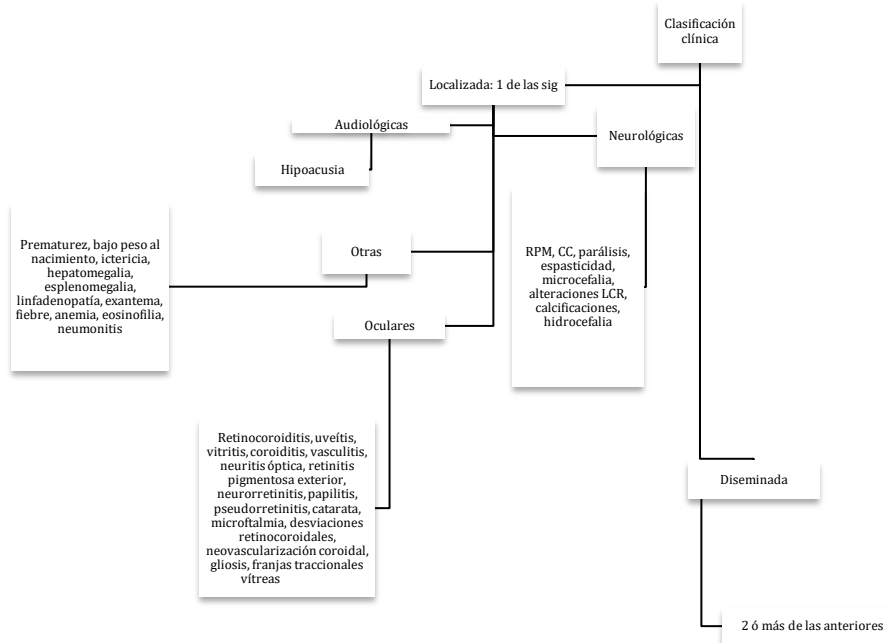


Figura 12. Clasificación clínica del paciente con toxoplasmosis congénita. Se incluyen las formas localizada y la forma diseminada de la enfermedad.

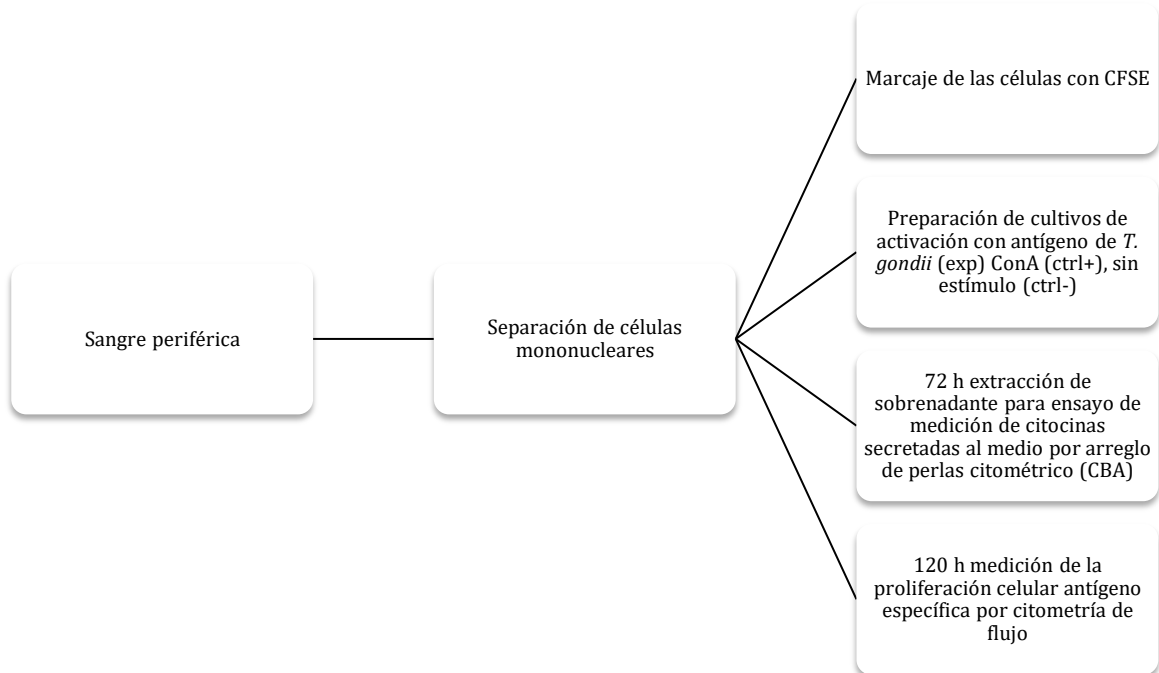


Figura 13. Estrategia para el estudio de perfil inmunológico en sangre periférica: ensayo de proliferación celular y CBA

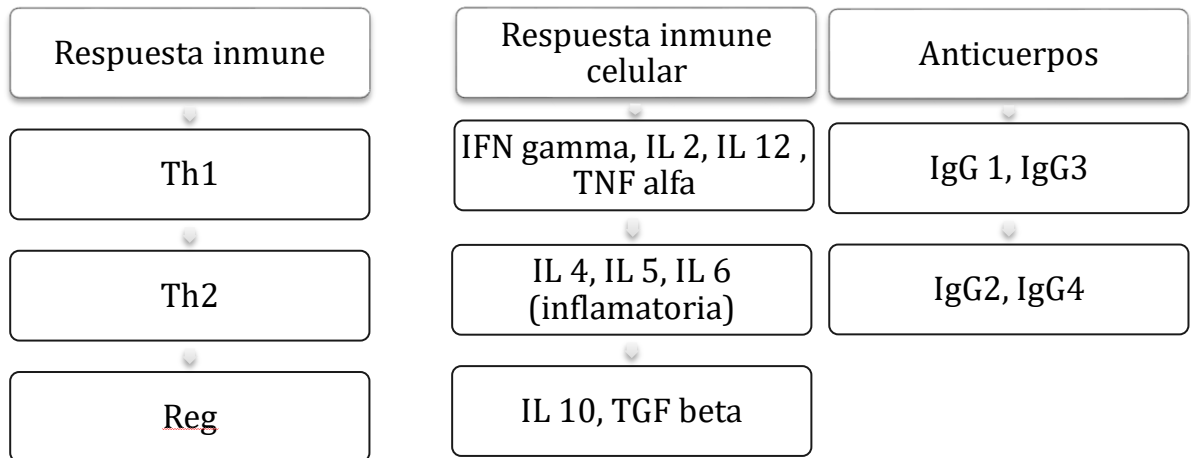


Figura 14. Estudio de perfil de respuesta inmune

Seguimiento clínico

Los pacientes infectados por *T. gondii* fueron evaluados para la búsqueda de manifestaciones de toxoplasmosis congénita: prematuridad, bajo peso al nacimiento, ictericia, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, exantema, fiebre, neumonitis, uveítis, vitritis, coroiditis, retinocoroiditis, vasculitis, neuritis óptica, retinitis pigmentosa exterior, neurorretinitis, papilitis, pseudorretinitis, catarata, microftalmia, desviaciones retinocoroidales, neovascularización coroidal, gliosis, franjas traccionales vítreas, hipoacusia, retraso psicomotor –leve, moderado o grave-, convulsiones, parálisis, espasticidad, microcefalia, alteraciones del líquido cefalorraquídeo, calcificaciones intraparenquimatosas, hidrocefalia. Además de la valoración mensual en el Servicio de Infectología (donde se buscó intencionadamente hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, exantema, fiebre, anemia, eosinofilia o neumonitis), se evaluó fondo de ojo por parte del servicio de Oftalmología cada 6 meses, se realizó tamiz auditivo por parte de Audiología al ingreso del paciente y se realizó valoración neurológica completa (en busca de retraso psicomotor, convulsiones, parálisis, espasticidad, microcefalia o hidrocefalia) por el servicio de Neurología, cada 6 meses. Asimismo, se llevó a cabo seguimiento mediante una evaluación longitudinal del desarrollo psicomotor por parte del Laboratorio de Neurodesarrollo: se efectuaron estudios para valorar la integridad neurológica, que incluyeron la prueba de Braselton dentro de los 3 primeros días de vida, y la escala de desarrollo infantil de Bayley al mes, 6 y 12 meses de vida. Los pacientes con retraso psicomotor acudieron por lo menos una vez al mes. Los estudios complementarios que se efectuaron, en caso necesario, fueron electroencefalografía, US cerebral, TC cráneo o RM cerebral, y potenciales evocados auditivos y visuales del tallo cerebral.

En los niños en que se corroboró toxoplasmosis congénita, se les indicó tratamiento con el esquema de pirimetamina más TMP/SMX por un año, así como tratamiento de rescate con ácido fólico. Se corroboró el apego al tratamiento mediante biometría hemática en cada consulta, donde se encontró, en la mayoría de los casos, neutropenia secundaria al uso de pirimetamina.

Ubicación del estudio

Esta tesis se insertó en el proyecto de investigación “Toxoplasmosis congénita. Relación de los polimorfismos de genes del parásito y de la respuesta inmune de la madre y del hijo con la expresión, la actividad biológica, la transmisión vertical y la patogenia fetal”, con No. registro 060/2011 del INP y con apoyo de CONACYT (no. 139721), en el que se buscó analizar la relación haplotipo/fenotipo en la toxoplasmosis congénita, esto es, identificar polimorfismos de genes de *T. gondii* (haplogrupos) y perfiles de respuesta inmune relacionados con transmisión vertical o patología fetal. Esta tesis se concentró en la relación entre el perfil inmune del neonato y las manifestaciones clínicas.

Definición de variables

Variables cualitativas

Perfil de la respuesta inmune: De acuerdo a los resultados del nivel de expresión de las citocinas extracelulares se formaron 2 grupos:

-con perfil no regulado

Th1 sin Treg, o

Th2

-con perfil regulado

Th1 con Treg

Cualitativa, dicotómica.

Perfil clínico del paciente: se evaluaron los signos y síntomas presentes en infección congénita por *Toxoplasma gondii*. De acuerdo a esto se formaron 2 grupos:

-con manifestaciones clínicas localizadas: manifestaciones de 1 de los siguientes apartados: audiológicas, neurológicas, oculares, o 1 de las otras manifestaciones

-con manifestaciones clínicas diseminadas: 2 o más de las anteriores

Cualitativa, dicotómica.

Caso de infección congénita. Menor de 7 días de vida infectado por *T. gondii*, demostrado por uno o más de los puntos descritos en el algoritmo, independientemente de la presencia de signos clínicos:

Manifestaciones clínicas. Cualquiera de las siguientes:

Neurológicas (retraso psicomotor –leve, moderado o grave-, crisis convulsivas, parálisis, espasticidad, microcefalia, líquido cefalorraquídeo anormal, calcificaciones intracraneales, hidrocefalia)

-Retraso psicomotor: Aparición de hitos del desarrollo (aptitudes motrices, sensoriales, cognitivas e interactivas) con una secuencia lenta para la edad y/o cualitativamente alterada a lo largo de los 12 primeros meses de vida, confirmado mediante las escalas de Braselton o Bayley. Variable cualitativa ordinal: sin retraso, retraso leve, moderado, grave.

Sin retraso: Coeficiente global de desarrollo >95%, déficit global <5%

Leve: Coeficiente global de desarrollo de 85-95%; déficit global de 5-15%.

Moderado: Coeficiente global de desarrollo de 60-85%; déficit global de 16-40%.

Grave: Coeficiente global de desarrollo de menos de 40-59%; déficit global de 41-60% o más.

-Crisis convulsivas: contracciones bruscas, violentas e involuntarias de un grupo muscular. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Parálisis: proceso anormal caracterizado por la pérdida de función muscular o de sensibilidad de acuerdo a una exploración neurológica detallada. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Espasticidad: hallazgo a la exploración neurológica detallada que consiste en un trastorno motor del sistema nervioso en el que algunos músculos se mantienen permanentemente contraídos. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Microcefalia: anomalía congénita caracterizada por un tamaño anormalmente pequeño de la cabeza en relación con el resto del cuerpo y por un subdesarrollo del cerebro que conduce a cierto grado de retraso mental. La medición de la circunferencia de la cabeza se encuentra más de dos desviaciones estándar por debajo del tamaño medio para la edad y el sexo, y presenta una frente estrecha e inclinada hacia atrás, un occipucio aplanado y un vértex puntiagudo. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Líquido cefalorraquídeo anormal: alteración en el contenido de proteínas (normal: <170mg/dl en neonatos), glucosa (normal: 1/2-2/3 partes de la glucosa sérica) o celularidad (normal: 5-35 linfocitos/mm³ en neonatos) de un líquido cefalorraquídeo. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Calcificaciones intracraneales: acúmulo de sales de calcio en el tejido cerebral observadas mediante neuroimagen (ultrasonido transfontanelar, tomografía computada o resonancia magnética). Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Hidrocefalia: acumulación excesiva de LCR en el cerebro que ocasiona dilatación anormal del sistema ventricular, con o sin aumento de la presión intracraneana y vista por neuroimagen (ultrasonido transfontanelar, tomografía computada o resonancia magnética). Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

Oculares (retinocoroiditis, uveítis, vitritis, coroiditis, vasculitis, neuritis óptica, retinitis pigmentosa exterior, neurorretinitis, papilitis, pseudorretinitis, catarata, microftalmia, desviaciones retinocoroidales, neovascularización coroidal, gliosis, franjas traccionales vítreas)

-Retinocoroiditis: Inflamación de la retina y de la capa coroides del ojo observada por oftalmólogo mediante exploración de fondo de ojo. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Uveítis: inflamación de la úvea, lámina intermedia del ojo situada entre la esclerótica y la retina, vista en exploración oftalmológica detallada. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Vitritis: Presencia de células inflamatorias en la cavidad vítrea documentada por oftalmólogo. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Coroiditis: Inflamación de la coroides vista por exploración oftalmológica. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Vasculitis: Inflamación de los vasos sanguíneos, determinando así deterioro u obstrucción al flujo de sangre y daño a la integridad de la pared vascular, en este caso referida a nivel oftalmológico. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Neuritis óptica: Inflamación del nervio óptico que puede originar una pérdida de visión parcial o completa repentina, documentada por oftalmólogo. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Retinitis pigmentosa exterior: Desorden que involucra la retina del ojo y causa reducción o pérdida, de forma gradual y progresiva, en su habilidad para sentir la luz, visto en exploración oftalmológica detallada. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Neurorretinitis: Inflamación de la retina y del nervio óptico del ojo documentada por el servicio de oftalmología. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Papilitis: Edema de la papila óptica secundaria a inflamación o compresión, vista en exploración de fondo de ojo. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Pseudorretinitis: Degeneración pigmentaria de la retina referida por oftalmólogo. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Catarata: opacificación total o parcial del cristalino que provoca que la luz se disperse dentro del ojo y no se pueda enfocar en la retina, creando imágenes difusas y problemas para apreciar los colores y cambios de contraste. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Microftalmia: anomalía congénita que se caracteriza por un tamaño anormalmente pequeño del globo ocular, diagnosticado clínicamente con la observación del globo ocular por parte de un oftalmólogo. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Desviaciones retinocoroidales: Dirección viciosa o anormal de la retina y coroides, referida por oftalmólogo. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Neovascularización coroidal: aparición de nuevos vasos coroideos, acompañados de tejido conjuntivo, como respuesta a situaciones de isquemia prolongada, documentada por el servicio de oftalmología. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Gliosis: Modificación de la relación normal entre el tejido neurorretinal y el tejido de sostén que se produce en los casos de displasia retiniana, produciéndose un excesivo crecimiento de los segundos para compensar la aplasia de los primeros. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Franjas traccionales vítreas: Alteraciones causadas por el desprendimiento incompleto del vítreo con tracción persistente en la mácula, con cambios cistoides y disminución de la agudeza visual, visto por oftalmólogo. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

Audiológicas (hipoacusia)

-Hipoacusia: pérdida de la capacidad auditiva con dificultad o imposibilidad para la audición normal, encontrada mediante tamiz auditivo o potenciales evocados auditivos. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

Otras (prematurez, bajo peso al nacimiento, ictericia, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, exantema, fiebre, neumonitis).

-Prematurez: Nacimiento previo a completar 37 semanas de gestación. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Bajo peso al nacimiento: Peso al nacer menor a 2,500 g. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Ictericia: Coloración amarillenta de la piel y mucosas debida a un aumento de la bilirrubina que se acumula en los tejidos, sobre todo aquellos con mayor número de fibras elásticas. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Hepatomegalia: Aumento patológico del tamaño del hígado corroborado mediante percusión del órgano a nivel del borde superior, a lo largo de la línea medio-clavicular, o mediante palpación del borde hepático inferior (medición de la distancia entre el margen costal derecho y el borde hepático inferior, a nivel de la LMC, en posición supina y al final de la espiración). El hígado puede ser palpado hasta 3 cm debajo del borde costal derecho en el neonato, 2 cm bajo el reborde costal en lactantes, y 1 cm hasta la edad de 7 años. El tamaño total del hígado a la semana de edad es de 4.5 a 5 cm, a los 12 años de 7 a 8 cm en los niños y de 6 a 6.5 cm en las niñas. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Esplenomegalia: agrandamiento patológico del bazo, encontrado mediante palpación del mismo a 2 cm por debajo del reborde costal (estando el paciente en decúbito supino, palpar desde la pelvis en dirección al reborde costal izquierdo durante la inspiración profunda). Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Linfadenopatía: aumento de volumen de un ganglio linfático confirmado por medición con cinta métrica (>0.5 cm en región epitroclear, 1.5 cm en región inguinal y 1 cm en el resto de las regiones linfáticas). Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Exantema: Erupción cutánea consecuencia de esta enfermedad infecciosa. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Fiebre: Aumento patológico de la temperatura corporal igual o mayor a 38°C. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Anemia: disminución de la hemoglobina por debajo de los límites normales (en niños <11g/dl). Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Eosinofilia: presencia de >500 eosinófilos/mcl en sangre periférica. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

-Neumonitis: inflamación pulmonar limitada al intersticio donde existe exudado inflamatorio alrededor de los alveolos. La imagen radiológica muestra un patrón intersticial. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

Manifestaciones clínicas localizadas/neurológicas. Manifestaciones únicamente de sistema nervioso central, ya sea retraso psicomotor (leve, moderado o severo), crisis convulsivas, parálisis, hidro/microcefalia, calcificaciones intracraneales, líquido cefalorraquídeo anormal, espasticidad. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

Manifestaciones clínicas diseminadas. Manifestaciones de dos o más de los siguientes apartados: audiológicos, neurológicos u oculares. En el caso de otros, dos o más de estas manifestaciones. Variable cualitativa dicotómica: sí/no.

Manifestaciones clínicas leves. Manifestaciones que no ponen en riesgo la vida y donde los pacientes pueden recibir tratamiento de forma ambulatoria.

Manifestaciones clínicas moderadas/graves. Manifestaciones que ponen en riesgo la vida y/o requieren hospitalización.

Variables cuantitativas

Índice de proliferación. Se mide con índice de reactividad de los linfocitos. Variable numérica continua.

Niveles de citocinas. Los niveles de citocinas se miden en ng/mL, por lo que son cuantitativas, numéricas continuas.

Niveles de anticuerpos. Los niveles de anticuerpos se miden en unidades de absorbancia, por lo que son numéricas continuas.

-Con las dos anteriores, que se dicotomizaron con base en punto de corte en positivos o negativos, se construyeron las siguientes variables:

Perfil (fenotipo) de respuesta inmune:

-Th1 regulado (expresión de anticuerpos y citocinas Th1 IgG1/IgG3, IFN- γ /IL-12/TNF- α + IL-10 y/o TGF- β).

-Th1 no regulado o Th2: (IgG1/IgG3, IFN- γ /IL-2/IL-12/TNF- α sin IL-10 o TGF- β ; o bien IgG2/IgG4/IgE, IL-4/IL-5/IL-6).

Variable cualitativa dicotómica.

Tamaño de muestra

Originalmente, se planeó que el tipo de estudio fuera cohorte descriptiva longitudinal. Así, se calculó el tamaño de muestra del presente estudio para apoyar la hipótesis de que entre los pacientes infectados por *Toxoplasma gondii* con Th1 no regulado y/o Th2 aumentaba la probabilidad de presentar manifestaciones clínicas diseminadas durante el primer año de vida, utilizando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{2 \left(Z_{1-\alpha/2} \sqrt{2\bar{P}(1-\bar{P})} + Z_{1-\beta} \sqrt{P_{\text{No regulado}}(1-P_{\text{No regulado}}) + P_{\text{Regulado}}(1-P_{\text{Regulado}})} \right)^2}{(P_{\text{No regulado}} - P_{\text{Regulado}})^2}$$

Donde:

n : Tamaño de muestra de un grupo de comparación (perfil inmunológico regulado y no regulado)

$Z_{1-\alpha/2}$: Valor de Z que corresponde al nivel de probabilidad del error tipo I

$Z_{1-\beta}$: Valor de Z que corresponde al nivel de probabilidad del error tipo II

\bar{P} : Proporción media de manifestaciones clínicas de los dos grupos sometidos a la comparación

$P_{\text{No regulado}}$: Proporción de los casos que presentan manifestaciones clínicas diseminadas al año de vida en el grupo de niños con perfil inmunológico no regulado

P_{Regulado} : Proporción de los casos que presentan manifestaciones clínicas diseminadas al año de vida en el grupo de niños con perfil inmunológico regulado

Se consideró adecuado suponer que en el grupo de niños con perfil inmunológico no regulado, 80% tendría manifestaciones clínicas diseminadas, y en el grupo regulado 40% tendría manifestaciones clínicas diseminadas.

Probabilidad del error tipo I y II se establece $p < 0.05$ y $p < 0.2$, respectivamente, por lo que $Z_{1-0.05/2} = 1.96$ y $Z_{1-0.2} = 0.84$. Entonces,

$$n = \frac{2 \left(1.96 \sqrt{2 \times 0.6 \times (1 - 0.6)} + 0.84 \sqrt{0.8 \times (1 - 0.8) + 0.4 \times (1 - 0.4)} \right)^2}{(0.8 - 0.4)^2}$$

$$= 44.6 \approx 45$$

Por tanto, en cada uno de los dos grupos se requerían 45 casos. Dado que no se alcanzó el tamaño de muestra, se limitó a describir los hallazgos en el seguimiento de 17 casos.

Análisis estadístico

Estadística descriptiva con distribuciones de frecuencias relativas y absolutas para variables categóricas. Para variable numéricas continuas, como los índices de proliferación o la concentración de citocinas, se usó comparación de medias por t de student o U de Mann Whitney dependiendo de la distribución. Se realizó además prueba exacta de Fisher una vez que se dicotomizaron las variables como positivas o negativas. Se utilizó el paquete estadístico SPSS 21.0.

Aspectos éticos

El proyecto de investigación fue diseñado conforme a la normativa internacional y nacional de estudios en seres humanos de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, (artículos 67, 68, 69). No se trató de un estudio de

intervención, sino observacional, y los casos fueron intervenidos médicamente de acuerdo a los estándares internacionales, nacionales y de los propios Institutos donde se llevó a cabo el manejo de los pacientes, ofreciéndoles tratamiento. Se aseguró la confidencialidad de los datos de los pacientes. Se siguieron las guías de buenas prácticas clínicas. Los padres o tutores de los menores firmaron carta de consentimiento informado, aprobada por el Comité de Ética en Investigación, como parte integral del proyecto en el que se insertó la presente tesis: “Toxoplasmosis congénita. Relación de los polimorfismos de genes del parásito y de la respuesta inmune de la madre y del hijo con la expresión, la actividad biológica, la transmisión vertical y la patología fetal” con número de registro en el INP 060/2011.

RESULTADOS

Aspectos clínicos

De los 17 casos de toxoplasmosis congénita, 12 se confirmaron antes del día 13 de vida, en parte gracias al tamiz pre y posnatal. Nueve fueron pacientes del sexo masculino y ocho del sexo femenino. La mayoría de los pacientes nacieron a término, sólo cinco fueron pretérmino. Tres pacientes cursaron con peso bajo para la edad gestacional y dos con peso muy bajo para la edad gestacional, todos ellos fueron pacientes de término (cuadro 3). Dos pacientes murieron *in utero*, por lo que no fue posible realizarles respuesta inmune.

No hubo un predominio de sexo afectado, y en 12 de 17 casos (70.5%) se presentaban complicaciones ya desde la gestación (desde amenaza de aborto hasta oligohidramnios o hidropesía fetal), como es esperado en los casos graves.

Dentro de las manifestaciones clínicas y radiológicas, los pacientes presentaron cierto grado de retraso psicomotor (ocho pacientes leve, dos pacientes moderado y tres pacientes grave); cinco se encontraron espásticos, cinco también con calcificaciones intracraneales, cuatro con hidrocefalia, uno con microcefalia y otro más con ambas alteraciones. Además se reportó atrofia cerebral en cuatro casos, alteración de la vía visual en potenciales visuales en tres casos, y una de las siguientes manifestaciones en distintos casos: macrocefalia, hemorragia intracraneal, asimetría ventricular, hiperproteíorraquia y síndrome convulsivo que correlacionó por electroencefalograma (cuadro 3).

De las manifestaciones oculares, sólo en dos pacientes se reportó retinocoroiditis, otras manifestaciones a este nivel fueron: de un mismo paciente microftalmia y catarata congénita bilateral, de otro paciente desprendimiento retiniano total bilateral y hemorragias subcoroideas bilaterales, y finalmente en otro hemorragia subhialoidea y retiniana, los últimos dos también con uveítis (cuadro 3).

De las manifestaciones audiológicas, tres pacientes cursaron con hipoacusia (cuadro 3). Finalmente, de las manifestaciones generales, siete pacientes presentaron hepatomegalia y cinco esplenomegalia, seis cursaron con ictericia. Otras manifestaciones encontradas fueron: trombocitopenia en dos casos, y uno de los siguientes en distintos casos: linfadenopatías generalizadas, anemia, leucopenia y rash petequial (cuadro 3).

Los pacientes que fueron diagnosticados posterior a la sospecha clínica presentaron más manifestaciones clínicas que aquellos pacientes detectados por medio de tamiz pre o posnatal. Aún así, entre los pacientes detectados por tamiz prenatal hubo casos sintomáticos, los cuales presentaron retraso psicomotor leve, espasticidad y hepatomegalia (cuadro 3).

Los pacientes detectados por tamiz posnatal presentaron más manifestaciones que aquellos que provenían del protocolo de tamiz prenatal, tales como retraso psicomotor leve, moderado o grave, espasticidad, hidrocefalia, microcefalia, calcificaciones intracraneales,

atrofia cerebral, hemorragia intracraneal, hemorragia subhialoidea y subretiniana, uveítis, hipoacusia, ictericia, hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatías generalizadas (cuadro 3).

Finalmente, los pacientes detectados como casos clínicos cursaron con el mayor número de manifestaciones como retraso psicomotor leve o grave, crisis convulsivas con alteración en EEG, hiperproteinorraquia, hidrocefalia, microcefalia, macrocefalia, calcificaciones intracraneales, atrofia cerebral, asimetría ventricular, retinocoroiditis, microftalmia, hemorragia subcoroidea, desprendimiento de retina, uveítis, catarata, hipoacusia, ictericia, hepatomegalia, esplenomegalia y rash (cuadro 3).

En cuanto a la localización, los pacientes detectados a través de tamiz prenatal presentaron únicamente clínica neurológica (localizada), mientras que los pacientes diagnosticados a través de tamiz posnatal o por manifestaciones clínicas presentaron clínica neurológica (localizada) o diseminada (cuadro 3).

Asimismo, en cuanto a gravedad, los pacientes que fueron detectados a través de tamiz prenatal presentaron sólo clínica leve, mientras que aquellos diagnosticados a través de tamiz posnatal o por manifestaciones clínicas cursaron con clínica desde leve a grave. Se presentaron seis defunciones, en todos los casos el diagnóstico se realizó hasta que se presentaron como casos clínicos (cuadro 3).

En cuanto a las pruebas diagnósticas para confirmar infección por *T. gondii* en los 17 pacientes, todos los pacientes evaluados tuvieron anticuerpos IgG específicos evaluados por ELISA; 10 (59%) fueron positivos o sospechosos de neo-anticuerpos IgG en Western blot, y 12 (71%) tenían anticuerpos IgM (Cuadro 4). Doce de los 17 pacientes (71%) tuvieron PCR positiva, uno de ellos en el pulmón de un ratón inoculado con la muestra de líquido amniótico durante el embarazo (bioensayo). Hubo cinco casos en los que los títulos de IgG en ELISA fueron más altos en los niños que en sus madres o aumentaron en muestras consecutivas del recién nacido. Sólo dos pacientes presentaron cuatro pruebas de toxoplasmosis congénita positivas, seis pacientes presentaron tres pruebas positivas, otros seis tenían dos y tres sólo una (Cuadro 4). Así, el diagnóstico de laboratorio requirió de las cuatro pruebas disponibles para optimizar la sensibilidad.

Cabe describir a continuación dos casos de especial importancia:

El primer caso presentó coinfección por *T. gondii* y citomegalovirus. Se documentó *in utero* restricción del crecimiento intrauterino, hidrocefalia y oligohidramnios. Al nacimiento, se corroboró que hubo restricción del crecimiento intrauterino y peso bajo para la edad gestacional, en quien se diagnosticó la coinfección grave y diseminada a los cuatro días de vida extrauterina.

El diagnóstico de toxoplasmosis reveló avidéz de IgG elevada -lo que sugiere una etapa temprana de infección intrauterina- a pesar de estar cursando la fase aguda, demostrada por el incremento en la titulación de anticuerpos IgG por ELISA, aunque la PCR fue negativa. El diagnóstico de infección por citomegalovirus se confirmó a través de PCR en tiempo real.

El paciente recibió tratamiento para ambas infecciones, requirió hospitalización prolongada y presentó secuelas importantes. Dado que la toxoplasmosis y la infección por CMV tienen características clínicas superpuestas, las pruebas de laboratorio son cruciales para el diagnóstico diferencial, lo que en este caso permitió documentar ambas infecciones.

El segundo caso nos pareció relevante debido a que se encontró anoftalmia, hendidura facial tipo III izquierda y toxoplasmosis congénita, asociación no descrita previamente en la literatura. La madre presentaba un embarazo intrauterino con producto gemelar bicorial biamniótico pero se reportó posterior involución de uno de los sacos. En el octavo mes se documentó defecto palatino completo unilateral en el feto.

El tamiz auditivo demostró hipoacusia bilateral. La prueba de PCR fue negativa; el ELISA IgG positivo con avidéz alta; por Western Blot, la IgM se reportó indeterminada y la IgG positiva con presencia de neoanticuerpos comparado de forma simultánea con el suero de la madre, de quien se demostró IgG también con avidéz alta por ELISA; IgM e IgG positivos por Western Blot, y PCR negativa.

Se realizó tomografía de cráneo, donde se observó hendidura oblicua izquierda oro orbitaria, defecto parasagital izquierdo con ausencia de paladar óseo y blando en el mismo lado, vestíbulo izquierdo estrecho, atresia de coanas bilateral, cornetes izquierdos hipoplásicos, ausencia de globo ocular y nervio óptico izquierdos, con músculos extraoculares hipoplásicos.

Recibió tratamiento para *T. gondii* y se realizó la primera cirugía para corrección de defecto anatómico. La biopsia de mucosa del sitio de la anoftalmia demostró pseudoquistes de *Toxoplasma gondii*. Se corroboró el diagnóstico por inmunohistoquímica y PCR en el tejido.⁵⁹

Cuadro 3. Aspectos demográficos, características prenatales, manifestaciones clínicas, radiológicas, localización y severidad de los 17 pacientes infectados congénitamente por *Toxoplasma gondii*

Cuadro 3. Hallazgos clínicos en los casos de toxoplasmosis congénita

Origen del caso	Caso número	Sexo	Datos clínicos en el embarazo	Semanas de gestación al nacimiento	Peso al nacimiento (g)	Edad al diagnóstico (días)	Ictericia	Hepato-megalia	Espleno-megalia	Retino-coroiditis	Otras oculares	Hipoacusia	Espasticidad	Calcificaciones	Hidrocefalia/microcefalia	Retraso psicomotor	Otros neurológicos	Otros sistemas	Otros hallazgos	Localización infección	Gravedad de la infección		
Tamiz prenatal	1	M	Oligohidramnios	41	2838 (bajo)	0	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Cabeza en gota	-	microretrognatia	-	-		
	2	F	Amenaza de aborto	39	3080	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Leve	-	-	Neurológico	Leve		
	3	M	Preeclampsia, colestásis hepática	40	3260	0	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Quiste en TC	-	-		
	4	M	Hematoma placentario	38	2450 (bajo)	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Microcefalia	-	-	Púrpura fulminante secundaria a deficiencia de proteína C	Diseminado	Leve	
Tamiz postnatal	5	F	Preeclampsia	37	1615 (muy bajo)	26	-	-	-	-	-	-	+	-	Parenquimatosas	-	Leve	Potenciales visuales con alteración de la vía visual, hipertono de miembros inferiores y atrofia cerebral.	Linfadenopatías generalizadas, restricción del crecimiento intrauterino	-	Diseminado	Moderado/grave	
	6	M	-	40	3530	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Moderado	-	-	Estenosis hipertrofica del piloro	Neurológico	Leve	
	7	M	-	39	3180	10	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Moderado	-	-	Atrofia cerebral	Neurológico	Leve	
	8	M	Restricción del crecimiento intrauterino, hidrocefalia y oligohidramnios.	38	1383 (muy bajo)	4	-	+	+	-	-	Uveítis OI, hemorragia subhialoidea OI, hemorragia subretiniana OD	+	+	-	Subependimarias	Ambas	Grave	Hemorragia intracraneal	Restricción del crecimiento intrauterino	Coinfección congénita con CMV, hidrocele bilateral, PCA, FOP, daño pulmonar crónico por CMV, hipoplasia cerebelosa, exantema petequeal	Diseminado	Moderado/grave
Caso clínico	9	F	Toxoplasmosis aguda a las 6 SDG	38	2840	0	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Neurológico	Moderado/grave	
	10	F	Hidrocefalia	32	2400	28	-	-	-	-	-	-	-	-	Parenquimatosas	-	Leve	Asimetría ventricular secundaria a colapso ventricular, EEG con actividad epiletiforme, crisis convulsivas	-	Prematurez	Diseminado	Moderado/grave	
	11	F	Restricción de crecimiento intrauterino e hidrocefalia	38	1945 (bajo)	28	+	+	+	-	-	Microftalmia y catarata congénita bilateral	+	-	-	Periventriculares y parenquimatosas	Hidrocefalia	Grave	Atrofia cerebral, PEV con alteración de la vía visual	Restricción del crecimiento intrauterino	Leucopenia, trombocitopenia	Diseminado	Moderado/grave, defunción
	12	M	Oligohidramnios e hidrocefalia	32	1700	12	+	+	+	+	+	Uveítis y desprendimiento completo de retina bilateral, hemorragia subcoroidea bilateral	+	-	-	-	Grave	Hiperproteinorraqui a 4g/dL, PEV con alteración grado IV con dispersión temporal-cortical	Prematurez	Calcificaciones intrahepáticas	Diseminado	Moderado/grave, defunción	
13	M	-	nr	nr	30	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	Leve	Macrocefalia	-	Colestasis	Diseminado	Moderado/grave		
14	F	-	nr	nr	nr	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Rash petequeal	Diseminado	Moderado/grave, muerte perinatal	
15	M	Hidrops fetal	24	nr	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Hidrops fetal	Diseminado	Moderado/grave, óbito	
16	F	Hidrops fetal y polihidramnios	31	nr	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Diseminado	Moderado/grave, óbito	
17	F	Parto prematuro	26	nr	7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Prematurez	-	Colestasis, ascitis, trombocitopenia, anemia	Diseminado	Moderado/grave, defunción	

PEV= potenciales evocados visuales

Cuadro 4. Métodos diagnósticos confirmatorios en los 17 casos de infección congénita por *Toxoplasma gondii*

Caso	Avidez IgG	IgG WB	Aumento IgG en el tiempo	IgG neonato > madre	IgM WB	PCR	Técnicas diagnósticas
1	alta	neo	-	-	+	-	IgG WB con neoanticuerpos, IgM
2	baja	neo	-	-	+	+	IgG WB con neoanticuerpos, IgM, PCR
3	NR	+	-	-	+	+	IgM, bioensayo en ratón
4	alta	neo	-	-	+	-	IgG WB con neoanticuerpos, IgM
5	Limít	neo	-	-	+	+	IgG WB con neoanticuerpos, IgM, PCR
6	baja	neo	+	-	-	+	IgG WB con neoanticuerpos, baja avidéz con elevación de IgG por ELISA, PCR
7	Limít	+	-	-	+	+	IgM, PCR
8	alta	neo	+	-	+	-	IgG WB con neoanticuerpos, IgM, elevación de títulos de IgG por ELISA
9	alta	neo	-	-	-	+	IgG WB con neoanticuerpos, PCR en LA
10	alta	+	-	-	+	ind	IgM
11	Limít	neo	-	+	+	-	IgG WB con neoanticuerpos, IgM, IgG neonato > IgG madre
12	baja	neo	+	+	-	+	Elevación de títulos de IgG por ELISA, IgG neonato > IgG madre, IgG WB con neoanticuerpos, PCR
13	baja	neo	-	-	+	+	IgG WB con neoanticuerpos, IgM PCR
14	baja	NR	-	-	+	+	IgM, PCR
15	NR	-	nr	nr	-	+	PCR en muestra de cordón umbilical
16	NR	-	nr	nr	-	+	PCR en muestra de cordón umbilical
17	alta	+	+	+	+	+	Elevación de títulos de IgG por ELISA, IgG neonato > IgG madre, IgM, PCR

NR= no realizado, limít= limítrofe, neo= neoanticuerpos, LA= líquido amniótico, ind= indeterminado (muestra insuficiente)

Relación de cuadro clínico con perfil de respuesta inmune

En cuanto a la relación entre el perfil clínico y la respuesta inmune, se encontraron algunas diferencias entre grupos clasificados de acuerdo a la gravedad, si bien ninguna tuvo significancia estadística. Por ejemplo, en cuanto a gravedad, se presentó mayor índice de proliferación linfocitaria, tanto de linfocitos totales, como los CD8+ y CD19+ en aquellos pacientes con cuadros moderados/graves que en los pacientes con clínica leve (figura 15).

El TNF-alfa y el IFN-gamma fueron producidos de forma muy similar por todos los pacientes, fuesen con clínica leve o moderada/grave (figura 16). Sin embargo, el TGF-beta se produjo más en los casos leves que en los moderados/graves (figura 16).

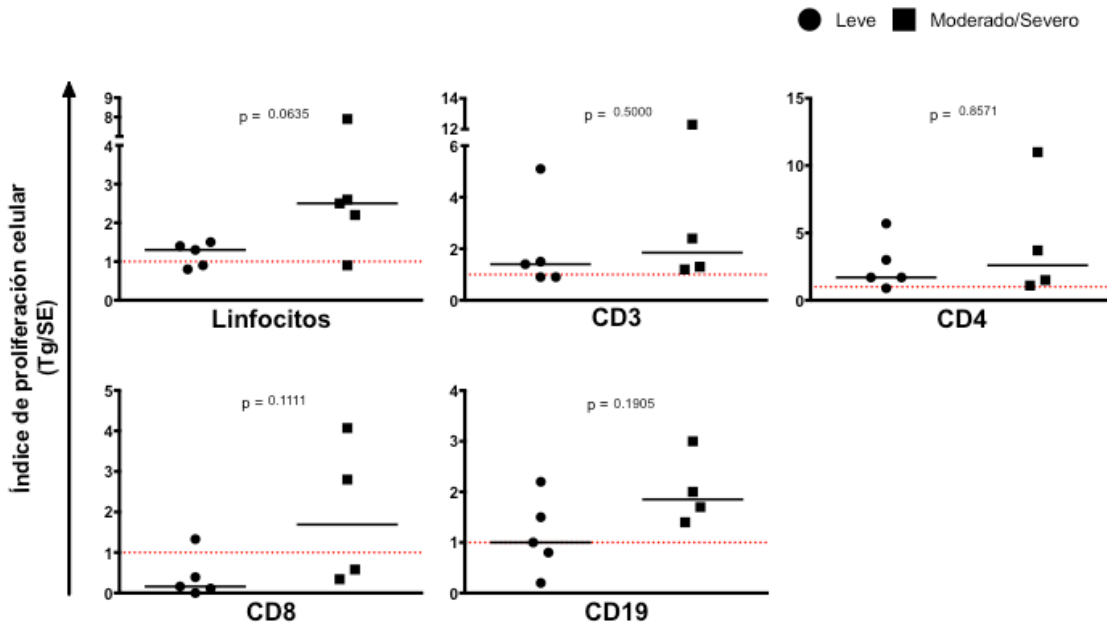


Figura 15. Índice de proliferación celular de linfocitos totales, CD3+, CD4+, CD8+ y CD19+ en pacientes con clínica leve VS moderada/grave. La línea negra es la mediana de cada grupo, mientras que la línea roja muestra el valor de corte.

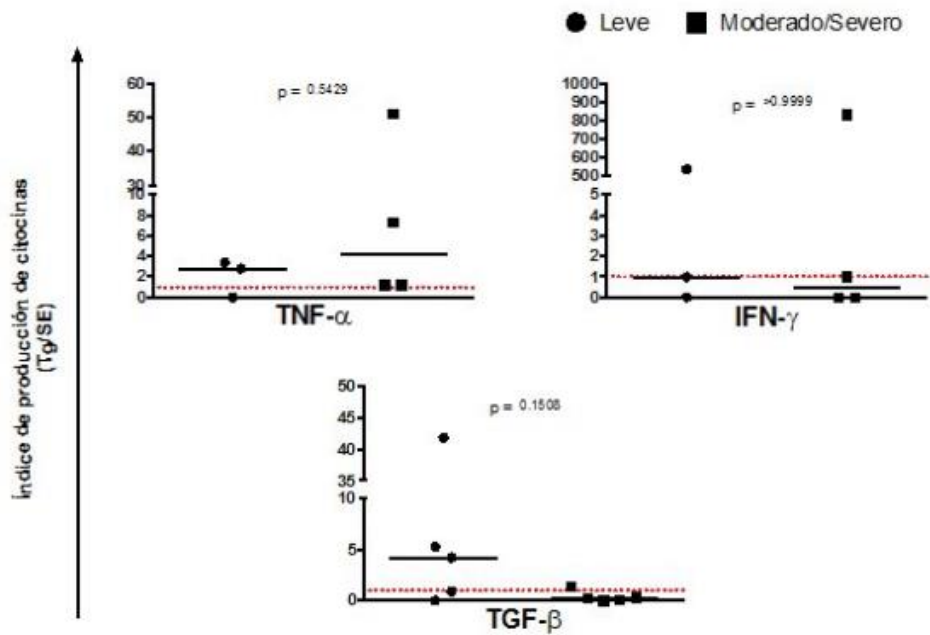


Figura 16. Índice de producción de TNF-alfa, IFN-gamma y TGF-beta en pacientes con clínica leve VS moderada/grave. La línea negra es la mediana de cada grupo, mientras que la línea roja muestra el valor de corte.

Aunque no hubo diferencia significativa en el nivel de la IL-2 entre los grupos, la mayoría de los pacientes con clínica leve la produjeron, mientras que en los pacientes con clínica moderada/grave sólo uno la produjo en un nivel muy bajo (figura 17). En cambio, la IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 se produjeron de manera muy similar en los pacientes con clínica leve y en aquellos con clínica moderada/grave.

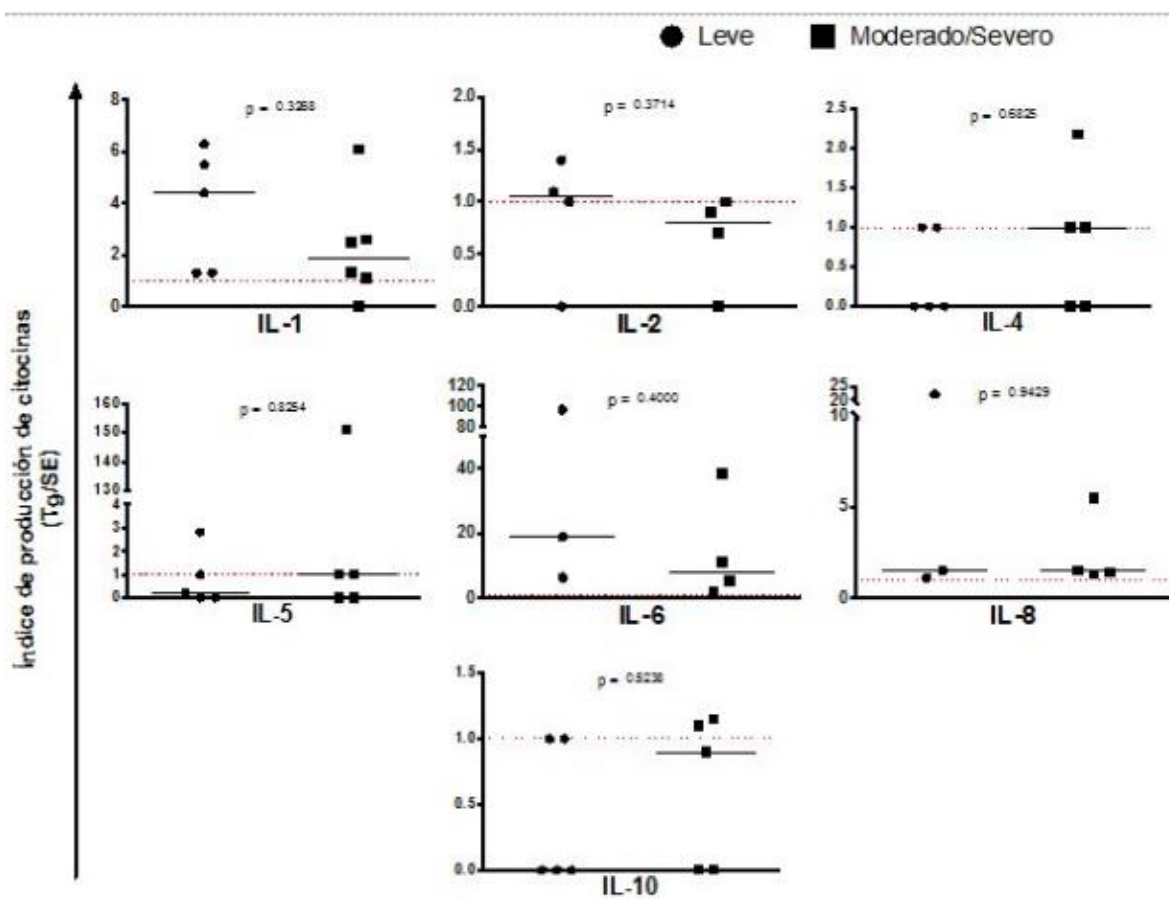


Figura 17. Índice de producción de IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10 en pacientes con clínica leve VS moderada/grave. La línea negra es la mediana de cada grupo, mientras que la línea roja muestra el valor de corte.

En relación a la respuesta humoral, cabe notar un mayor índice de reactividad de los anticuerpos IgA en pacientes con clínica leve en comparación con aquellos con clínica moderada/grave, y ninguno de éstos los produjo (figura 18). En cambio, se produjo un índice de reactividad muy similar de los anticuerpos de clase IgG1, IgG3, IgG2 o IgG4 entre los dos grupos, aunque cabe señalar que los de clase IgG4 específicamente no fueron producidos por ningún caso moderado/grave (figura 18).

En cuanto a localización, se observó una proliferación linfocitaria y de CD8 y CD19 discretamente mayor en pacientes con clínica diseminada que en aquellos con clínica neurológica (localizada) (figura 19).

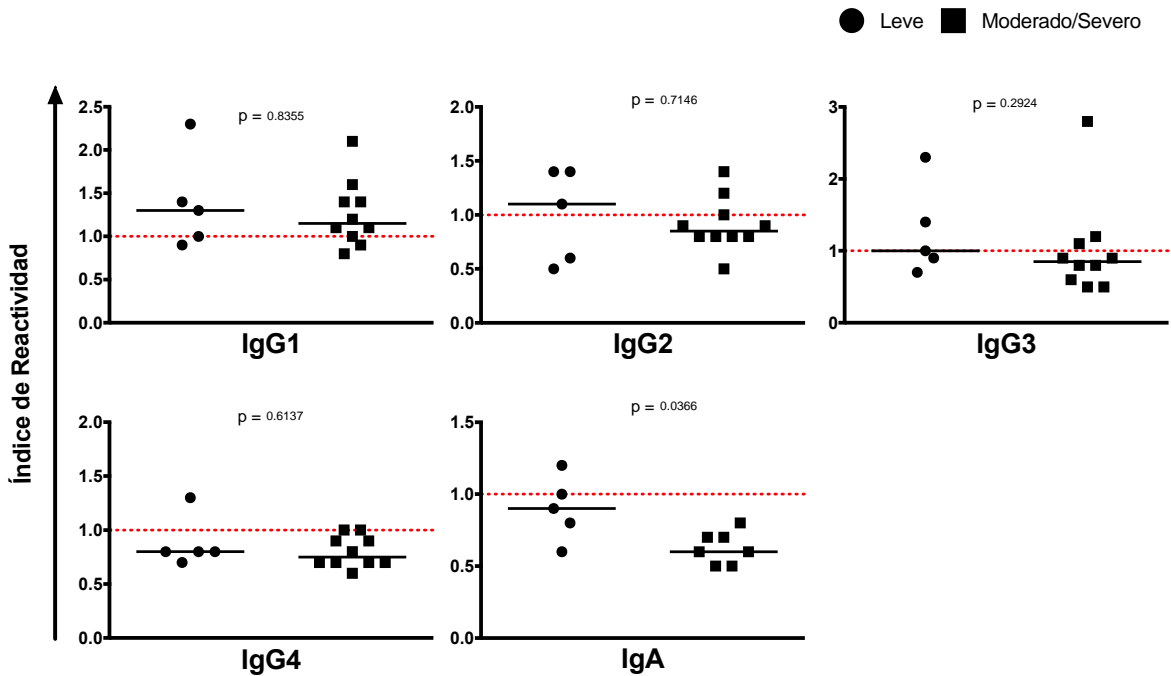


Figura 18. Índice de reactividad de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA en pacientes con clínica leve VS moderada/grave. La línea negra es la mediana de cada grupo, mientras que la línea roja muestra el valor de corte.

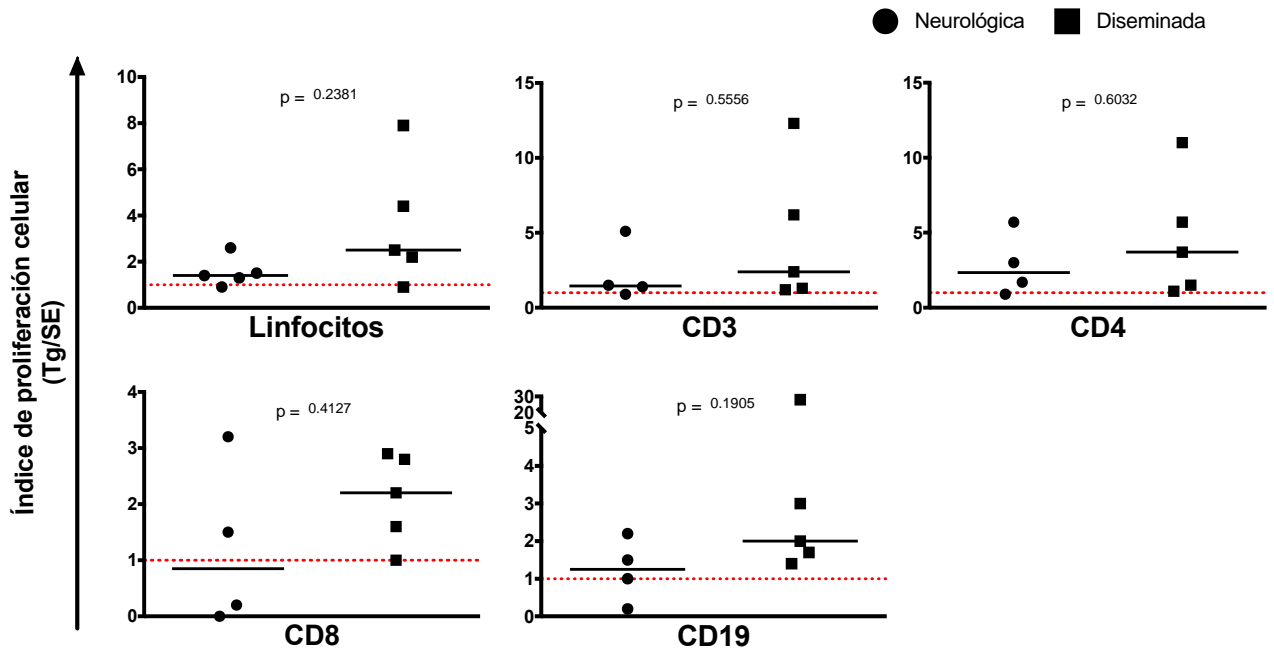


Figura 19. Índice de proliferación celular de linfocitos totales, CD3, CD4, CD8 y CD19 en pacientes con clínica neurológica VS diseminada. La línea negra es la mediana de cada grupo, mientras que la línea roja muestra el valor de corte.

Asimismo, se observó una discreta tendencia a mayor producción de TNF-alfa así como mayor proporción de positivos, en el grupo de pacientes con clínica diseminada que en aquellos con clínica neurológica (localizada) (figura 20). Aunque el IFN-gamma se produjo en niveles similares entre los grupos (no hubo diferencia significativa), cabe resaltar que hubo tres casos positivos (42%) dos de los cuales produjeron altos niveles, mientras que en el otro grupo sólo hubo un caso positivo, pero en niveles muy bajos. La producción de TGF-beta fue muy similar en ambos grupos (figura 20).

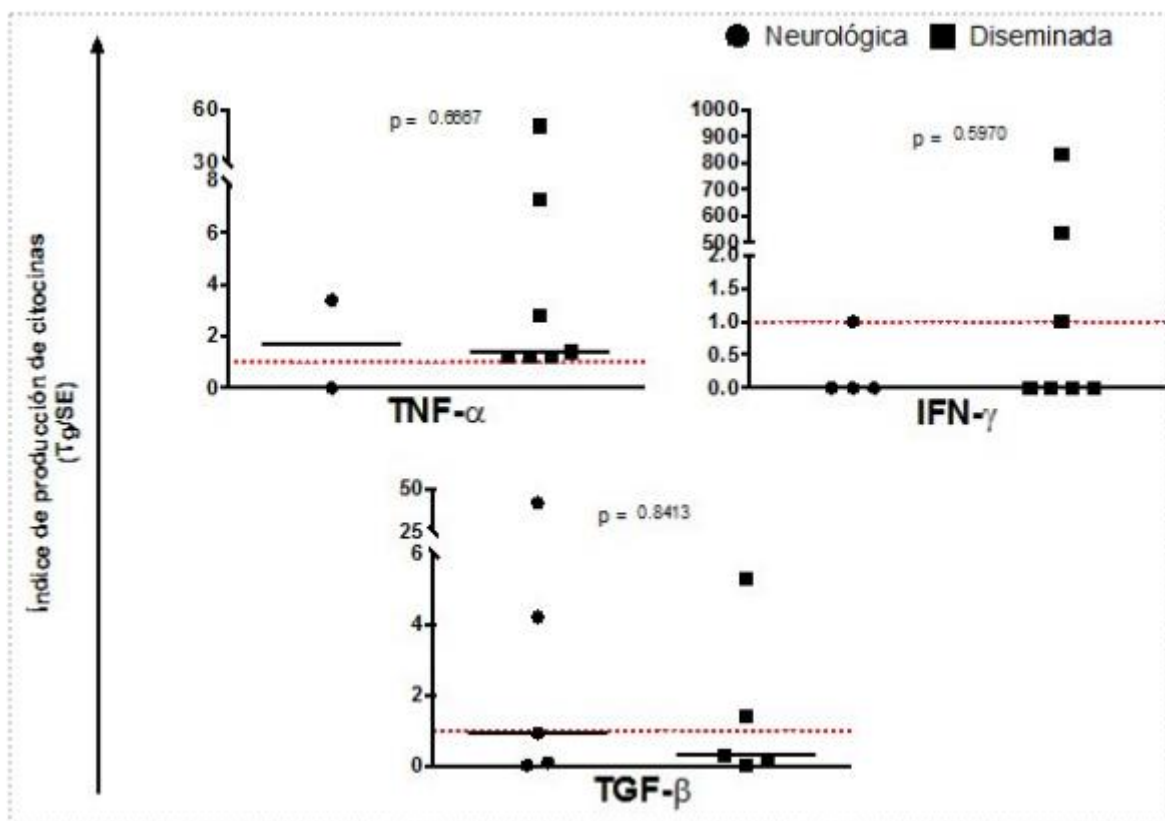


Figura 20. Índice de producción de TNF-alfa, IFN-gamma y TGF-beta en pacientes con clínica neurológica VS diseminada. La línea negra es la mediana de cada grupo, mientras que la línea roja muestra el valor de corte.

La IL-2 por su parte, se produjo en mayor nivel y proporción de pacientes con clínica neurológica (localizada) que en los pacientes con clínica diseminada (figura 21). Las otras interleucinas se produjeron en niveles similares por los pacientes de ambos grupos (figura 21).

Se encontró un índice de reactividad de anticuerpos IgA discretamente mayor en pacientes con clínica neurológica (localizada) en comparación con aquellos con clínica diseminada (figura 22). En cambio, se produjo un índice de reactividad muy similar de IgG1, IgG3, IgG2 e IgG4 entre los dos grupos.

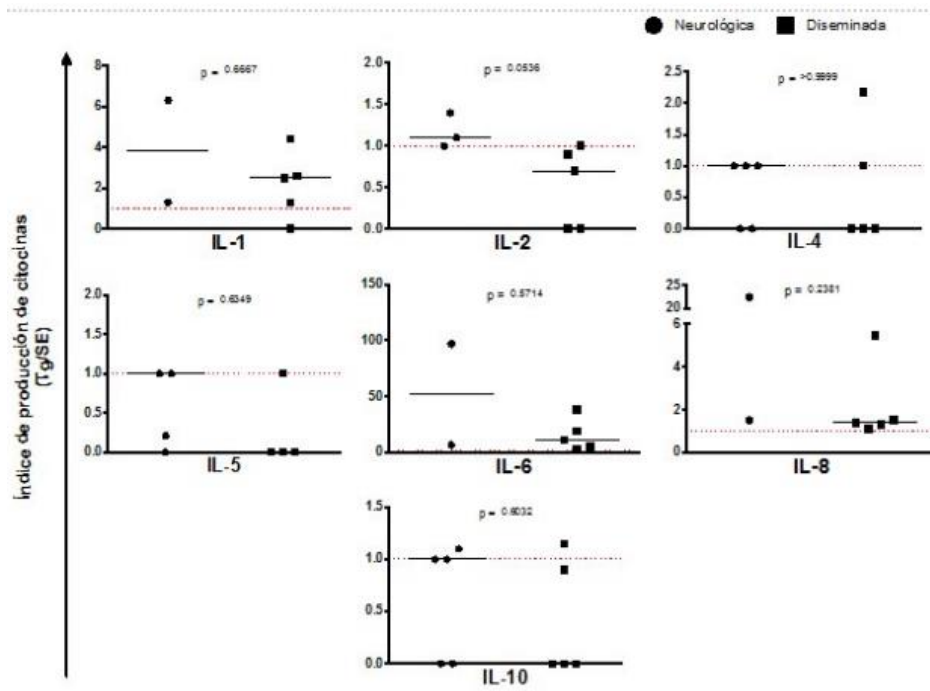


Figura 21. Índice de producción de IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10 en pacientes con clínica neurológica VS diseminada. La línea negra es la mediana de cada grupo, mientras que la línea roja muestra el valor de corte.

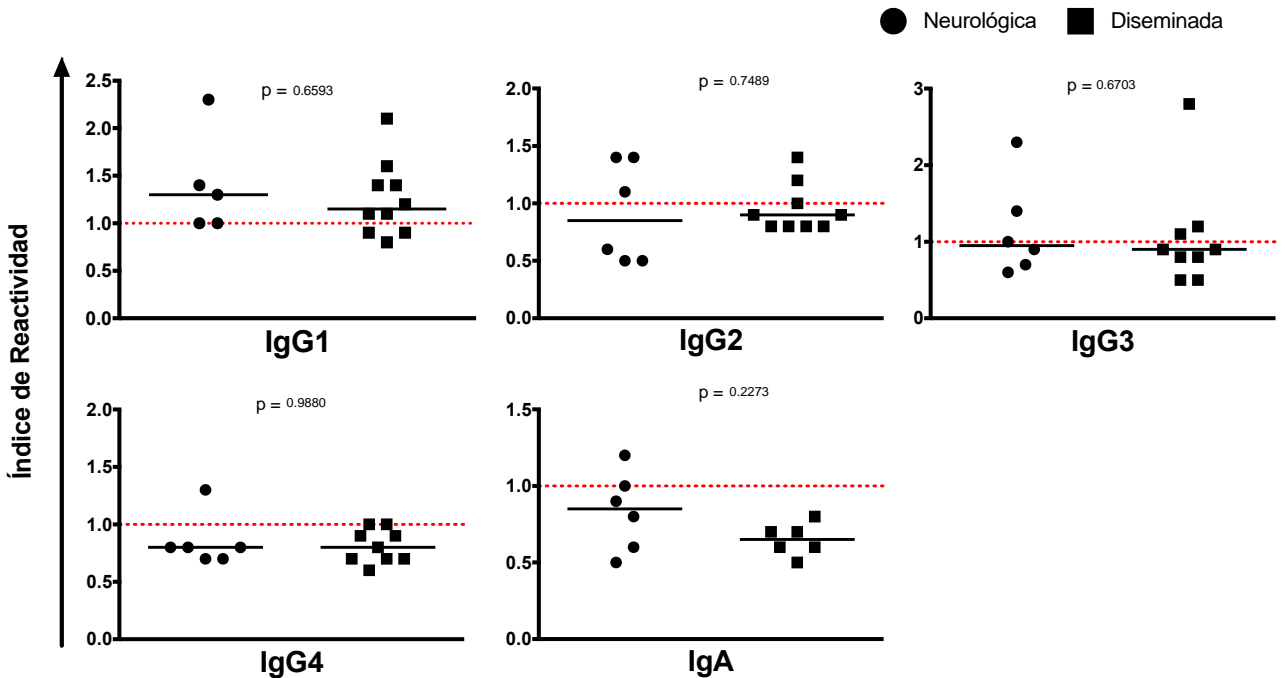


Figura 22. Índice de reactividad de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA en pacientes con clínica neurológica VS diseminada. La línea negra es la mediana de cada grupo, mientras que la línea roja muestra el valor de corte.

Al dicotomizar las variables, se realizó prueba exacta de Fisher, con la cual tampoco se encontró significancia estadística. Únicamente en cuanto a gravedad: la IL-2 se encontró que se produjo en un 80% de los casos leves vs tan sólo un 20% en los casos moderados/graves ($p=0.103$); por otro lado, el TNF-alfa se produjo en un 40% de los casos leves vs en 100% en los casos moderados/graves ($p=0.083$); y las CD8 proliferaron específicamente en un 40% de los casos leves vs en 100% de los casos moderados/graves ($p=0.119$).

DISCUSIÓN

En esta tesis se estudió un grupo de neonatos y dos fetos infectados congénitamente por *Toxoplasma gondii* en cuanto a la presentación clínica, y se buscó si la gravedad o la localización de los problemas clínicos se relacionó con el perfil inmune de los neonatos.

En este grupo de pacientes se presentó prematuridad en 29.4%, común denominador en cualquiera de los agentes del grupo TORCH, lo que contrasta con lo reportado por *Couvreur et al*, quienes reportaron este hallazgo en sólo un 10.9%.⁵⁵ Es posible que esto se deba a la mayor sobrevivencia en la actualidad de pacientes pretérmino gracias a los avances médicos desde entonces (1984).

Está descrito en la literatura que la tríada clásica asociada, descrita por primera vez por Sabin en 1942 y que contempla hidrocefalia, retinocoroiditis y calcificaciones cerebrales intraparenquimatosas, es poco frecuente.⁵⁵ En este estudio también se corroboró de forma poco frecuente, pues sólo el caso 13 presentó la tríada clásica. Por otro lado, está descrito que hasta un 75% de los pacientes infectados congénitamente por *T. gondii* son asintomáticos y hasta un 85% de éstos cursan con secuelas de toxoplasmosis congénita a largo plazo.⁵⁹ En la cohorte se demostró que el 100% de los casos fueron sintomáticos desde el nacimiento o lactancia temprana, puesto que en todos ellos se documentó por lo menos retraso psicomotor leve. Más aun, el porcentaje de presentación de retraso psicomotor fue del 100% *versus* tan sólo un 5% reportado por *Couvreur et al*.⁵⁵ Los porcentajes de presentación de otras manifestaciones clínicas tampoco fueron similares con respecto a lo descrito en la literatura internacional, en particular: ictericia (29% VS 10%), esplenomegalia (29% VS 41%), retinocoroiditis (12% VS 22%), hipoacusia (18% VS 10%), calcificaciones intracraneales (29% VS 11%), microcefalia (12% VS 5%) e hidrocefalia (24% VS 4%). Lo más probable es que la retinocoroiditis se haya presentado en un porcentaje inferior en nuestro grupo neonatal comparado con la literatura internacional debido a que ésta generalmente se presenta en etapas posteriores de la vida y no desde el nacimiento. En cambio, la gran mayoría de manifestaciones sistémicas o neurológicas, como la ictericia, hipoacusia, calcificaciones intracraneales, hidrocefalia y microcefalia, se presentaron en un porcentaje considerablemente mayor en nuestra población con respecto a lo descrito por otros autores internacionales, probablemente debido en buena medida a la virulencia de las cepas del parásito encontradas en México, aunque también debido al diagnóstico tardío y a la falta de tratamiento prenatal en algunos casos, como se analiza más adelante.

La gran proporción de casos con manifestaciones clínicas puede estar asociada con el momento del diagnóstico, ya que los signos fueron menos graves en los niños detectados antes del nacimiento. Cabe señalar que las madres se sometieron a tratamiento prenatal para evitar la transmisión vertical, y aunque ésta de todos modos ocurrió, el tratamiento pudo disminuir la carga parasitaria y permitir una mejor respuesta fetal ante el patógeno. De hecho, los pacientes detectados por tamiz prenatal presentaron únicamente clínica localizada (neurológica), leve. En cambio, los pacientes detectados por tamiz posnatal presentaron clínica diseminada en un 60% y moderada/grave en un 40%. Finalmente, los pacientes detectados como casos clínicos presentaron manifestaciones diseminadas en el 89% y moderadas/graves en el 100%. Esto resalta la importancia de efectuar un diagnóstico prenatal temprano para iniciar tratamiento oportuno y mejorar el pronóstico de la enfermedad. Desafortunadamente, los datos presentados también sugieren que rara vez se realiza el tamiz a mujeres embarazadas para infección por *T. gondii*, o por el resto de los agentes del grupo TORCH. Es fundamental descartar intencionadamente infecciones potencialmente congénitas en toda mujer embarazada, ya que frecuentemente no se piensa en ellas, en parte porque cuando ocurren, se presentan de forma subclínica en el embarazo. Cabe resaltar que siete pacientes se diagnosticaron al nacimiento y más de la mitad antes del día 13, lo que sugiere que la toxoplasmosis en México es más grave que en otras partes del mundo. Entre los factores que determinan la gravedad de la infección están el momento de la transmisión vertical durante el embarazo, el perfil inmunológico de la madre o el recién nacido, la carga del parásito y su virulencia. En este sentido, cabe resaltar que las cepas reportadas en México son mayormente tipo I o relacionadas a éstas, las cuales son altamente virulentas, y más importantemente, se han encontrado binomios infectados por dos cepas, lo que podría explicar por qué no hubo algún caso asintomático, como se ha reportado en países al norte de México y de Europa.^{12,31,35,36}

Es fundamental resaltar los dos casos que tuvieron especial relevancia, uno debido a coinfección con otro agente del grupo TORCH, y el segundo, a manifestaciones clínicas inusuales para *T. gondii*, situaciones no esperadas en ambos casos después de haber realizado una extensa revisión de la literatura.

La coinfección entre los patógenos del complejo TORCH ha sido escasamente investigada y hay muy pocos casos documentados de coinfección congénita por citomegalovirus y *T. gondii*: se encontró un informe de caso de un recién nacido prematuro con coinfección por VIH, CMV y *T. gondii* que inicialmente no tenía evidencia de enfermedad, pero requirió estudios de imagen repetidos y pruebas serológicas para confirmar el diagnóstico.⁶⁰ Con lo anterior, se confirma la importancia de estudiar posibles coinfecciones entre agentes del grupo TORCH, ya que incrementan los problemas clínicos y las secuelas.

Por otro lado, el diagnóstico de laboratorio de la toxoplasmosis congénita no es fácil debido a la posible variación de resultados, como se demuestra en esta cohorte. Si bien el estándar diagnóstico es la persistencia de IgG en el lactante más allá del primer año de vida -ya que a esa edad se descartaría que un resultado positivo fuese producto de anticuerpos maternos - no es pertinente esperar todo un año para establecer un diagnóstico de certeza, pues se requiere tomar decisión terapéutica. Así pues, para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita en la mayoría de los casos de esta cohorte se emplearon el resto de pruebas diagnósticas disponibles, incluyendo ELISA IgG con avidez, Western blot IgG e IgM y

PCR con bioensayo en ratón. Es fundamental recalcar ciertos aspectos de estas pruebas. La PCR puede ser negativa por la naturaleza intracelular del parásito, por lo que no necesariamente circula en el torrente sanguíneo durante la fase aguda.^{53,61} Esto ocurrió en un 29% de los pacientes detectados, lo que sugiere que el parásito estaba en los tejidos en el momento del diagnóstico y no circulaba en la sangre. Además, la IgM también fue negativa en otro 29% de los pacientes diagnosticados, pero el diagnóstico definitivo en ellos se estableció con al menos otra de las pruebas disponibles. La presencia de neoanticuerpos IgG en el neonato por Western blot se demostró en el 59% de los casos, lo que fue decisivo como apoyo en varios casos.³⁰ La elevación de títulos de IgG a través del tiempo y los títulos mayores de IgG en el neonato que en la madre, apoyaron el diagnóstico en un 29%, si bien ambas pruebas fueron menos importantes para establecer el diagnóstico. Es importante destacar que la avidéz no es una prueba confirmatoria para toxoplasmosis congénita, ya que refleja la combinación de anticuerpos maternos con los neonatales, porque cruzan la placenta durante el embarazo y pueden adquirirse mediante la lactancia. Aunque *Baquero et al* mencionan que la avidéz de IgG no tiene interés diagnóstico para el recién nacido con probable infección por *T. gondii*, de acuerdo a los hallazgos del presente estudio consideramos que tiene relevancia para conocer el tiempo aproximado en que se infectó el recién nacido y poder estimar así el riesgo de manifestaciones clínicas o secuelas, recordando de antemano que una avidéz baja sugiere una infección de menos de 12 semanas, mientras que una avidéz alta sugiere una infección mayor a este tiempo.⁵⁷ Los resultados mostrados resaltan la importancia de combinar varios métodos de diagnóstico. Además, el encontrar diferentes subclases de anticuerpos IgG entre madre e hijo en ELISA podría apoyar el diagnóstico de certeza, pero falta establecer su utilidad.^{62,63}

En cuanto a la relación entre el perfil de respuesta inmune y el perfil clínico, cabe mencionar que no se definió un perfil Th1 regulado, definido en el presente proyecto por la producción de IFN-gamma, IL-2, IL-12 y TNF-alfa, así como de anticuerpos IgG1 e IgG3, seguido de la producción de IL-10 y TGF-beta. Tampoco se encontró el perfil Th1 no regulado (definido por la producción de IFN-gamma, IL-2, IL-12 y TNF-alfa, así como de anticuerpos IgG1 e IgG3), o el Th2 (definido por la producción de IL-4, IL-5, IL-6, así como de anticuerpos IgG2 e IgG4). Pero se observaron algunas diferencias en la proliferación linfocitaria, la producción de algunas citocinas o en el índice de reactividad de algunos anticuerpos que nos parecen de importancia biológica, entre los grupos, clasificados por su localización o por su gravedad.

En primer lugar, se presentó mayor índice de proliferación linfocitaria, de CD8+ y CD19+ en aquellos pacientes con cuadros diseminados o graves que en los pacientes con localización neurológica o leve. Cabe recordar que los linfocitos CD8+ son citotóxicos para las células infectadas por *T. gondii* y existe una interrelación entre los linfocitos T CD4+ y CD8+ tanto para la inducción de la resistencia, como para el mantenimiento de la latencia, por lo que en cuadros más serios se corroboró su mayor índice de proliferación.¹¹ Lo que llama la atención es la relación con los CD19+, pues son los linfocitos que dan lugar a las células plasmáticas que producen los anticuerpos y se esperaba que algunas subclases (IgG1 e IgG3, además de la IgA) se relacionaran a protección. La última sí se asoció a un cuadro más leve, lo cual puede deberse a que tiene un papel neutralizante, y sobre todo, parece proteger al hospedero contra una reinfección.^{38,40}

En segundo lugar, en cuanto a la producción de algunas citocinas, el dato más significativo fue que en el caso de la IL-2 se observó mayor producción en los casos neurológicos con respecto a los diseminados, sugiriendo en este escenario su papel protector ya que se encuentra dentro del perfil Th1 regulado. También, la IL-2 y el TGF-beta se produjeron en mayor nivel y por mayor proporción de pacientes con clínica leve que en aquellos con clínica moderada/grave, lo que corrobora la hipótesis del papel protector de estas citocinas, reguladoras. Sin embargo, aunque no hubo significancia estadística, al analizar la producción de IL-10 de acuerdo a gravedad, ésta estuvo presente en dos pacientes con clínica moderada/grave y en ningún caso de clínica leve, contrario a lo que hubiéramos esperado de acuerdo a nuestra hipótesis inicial, ya que se ha demostrado que desactiva los macrófagos y reduce la destrucción de *T. gondii in vitro*,¹¹ por lo que regularía la respuesta inflamatoria.

Un resultado importante y complementario a los hallazgos de TGF-beta fue que hubo diferencias en la producción de TNF-alfa e IFN-gamma entre los pacientes con localización neurológica y aquellos con infección diseminada, siendo producidas por todos los neonatos del segundo grupo y sólo por uno de los casos de infección localizada; la primera tiene un papel importante en la prevención del desarrollo de la enfermedad y la segunda es clave para controlar la infección por *T. gondii*, ya que activa a los macrófagos para la producción de óxido nítrico. Ambas se asocian con una respuesta Th1 no regulada.

No hubo diferencias en la producción de IL-4 e IL-6 en ambos escenarios clínicos, quizá debido a que todos nuestros pacientes presentaron manifestaciones clínicas.¹¹

Finalmente, unas limitantes de este estudio radican en que no se buscaron células dendríticas, macrófagos/monocitos ni células natural killer, células que se consideran inducen la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-1, la IL-6 y el TNF-alfa, así como de la IL-12 y la IL-10. Tampoco se midió la producción de otras citocinas importantes como IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17 e IL-23, lo que hubiera sido interesante en términos de respuesta inmune. A pesar de no alcanzarse el tamaño de muestra necesario para el diseño del estudio, donde se requerían 45 pacientes para cada grupo, consideramos que los hallazgos descritos previamente son de interés biológico.

CONCLUSIONES

- A pesar de la baja incidencia conocida de la infección congénita por *T. gondii*, se logró el reclutamiento de 17 casos.
- La presentación de toxoplasmosis congénita en esta cohorte fue sintomática en todos los casos contrario a lo reportado en la literatura e independientemente de haberse realizado un diagnóstico prenatal o no, lo que se explica tanto por la presencia de infecciones dobles con cepas de alta virulencia como por una atención prenatal inadecuada. Sin embargo, las manifestaciones clínicas graves y diseminadas fueron predominantemente en aquellos pacientes detectados de forma clínica o posnatal.
- Debido a la complejidad y heterogeneidad de las manifestaciones clínicas, donde la triada clásica se presenta en un porcentaje muy bajo, es necesario combinar varios métodos para un diagnóstico preciso.
- En cuanto al perfil inmunológico, si bien no fue posible aceptar o rechazar la hipótesis del proyecto debido a que no se alcanzó el tamaño de muestra, y por ende no fue posible la medición de las citocinas y anticuerpos en todos los casos, el hallazgo más significativo al evaluar la producción de las distintas citocinas fue la mayor producción de IL-2, TGF-beta y anticuerpos IgA en los casos neurológicos que en aquellos diseminados, lo que tiene interés biológico, pues refuerza la hipótesis de que la respuesta inmune debe estar regulada para ser protectora y no dañina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dubey JP. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2a ed. USA: CRC Press Taylor & Francis Group; 2009.
2. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, Nelson. *Tratado de Pediatría*. Vol 1. 19a ed. Barcelona, España: McGraw Hill; 2011.
3. Sullivan Jr WJ, Smith AT, Joyce BR. Understanding mechanisms and the role of differentiation in pathogenesis of *Toxoplasma gondii*—a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 155–61.
4. Dubremetz JF, Ferguson DJ. The role played by electron microscopy in advancing our understanding of *Toxoplasma gondii* and other apicomplexans. *Int J Parasitol*. 2009; 39: 883–93.
5. Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol*. 2007; 10: 83-9.
6. Molestina RE, Payne TM, Coppens I, Sinai AP. Activation of NF- κ B by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I κ B to the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Sci*. 2003; 116: 4359-71.
7. Jokelainen P, Tagel M, Mötus K, Viltrop A, Lassen B. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in dairy and beef cattle: Large-scale epidemiological study in Estonia. *Vet Parasitol*. 2017; 236:137-43.
8. Boyer K, Hill D, Mui E, Wroblewski K, Karrison T, Dubey JP, Sautter M, Noble AG, Withers S, Swisher C, Heydemann P, Hosten T, Babiarz J, Lee D, Meier P, McLeod R; Toxoplasmosis Study Group. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clin Infect Dis*. 2011; 53: 1081-9.
9. Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol*. 2008; 38: 1257–78.
10. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. *Pathology of the human placenta*. 5 ed. Springer Science + Business Media, New York. 2006
11. Montoya JG, Boothroyd JC, Kovacs JA. *Toxoplasma gondii*. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. *Principles and practice on Infectious Diseases*. 8th ed. USA: Elsevier Churchill Livingstone; 2016. 3300-32.
12. Rico-Torres CP, Valenzuela-Moreno LF, Luna-Pastén H, Figueroa-Damián R, Gómez-Toscano V, Hernández-Delgado L, Escobedo-Torres MP, Correa D. High heterogeneity,

mixed infections and new genotypes in human congenital toxoplasmosis cases in the megacity of Central Mexico. *Acta Tropica*. 2018; 178: 124-129.

13. Ambroise-Thomas P, Petersen E. Congenital toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. France: Springer-Verlag; 2000.

14. Atmaca LS, Simsek T, Batioglu F. Clinical features and prognosis in ocular toxoplasmosis. *Jpn J Ophthalmol*. 2004; 48:386-91.

15. Ozgonul C, Besirli CG. Recent developments in the diagnosis and treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmic Res*. 2017; 57: 1-12.

16. Wallon M, Garweg JG, Abrahamowicz M, Cornu C, Vinault S, Quantin C, Bonithon-Kopp C, Picot S, Peyron F, Binquet C. Ophthalmic outcomes of congenital toxoplasmosis followed until adolescence. *Pediatrics*. 2014; 133: e601-8.

17. Jayakumar PN, Chandrashekar HS, Ellika S. Imaging of parasitic infections of the central nervous system. *Handb Clin Neurol*. 2013; 114: 37-64.

18. Guevara-Silva EA, Ramírez-Crescencio MA, Soto-Hernández JL, Cárdenas G. Central nervous system immune reconstitution inflammatory syndrome in AIDS: experience of a Mexican neurological centre. *Clin Neurol Neurosurg*. 2012; 114: 852-61.

19. Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Cedillo-Pelaez C, Vargas-Villavicencio JA, Luna-Pastén H, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Correa D. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012; 106: 653-9.

20. Dard C, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. *Trends Parasitol*. 2016; 32: 492-506.

21. Dubey JP Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol*. 2004; 126: 57-72.

22. American Academy of Pediatrics. Toxoplasmosis. En: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS, eds. Red Book: Informe 2015 del Comité sobre Enfermedades Infecciosas. 30a ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2015: 787-96.

23. Contopoulos D, Montoya JG. *Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis). En: Long SS, Pickering LK, Prober CG. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 4th ed. Philadelphia, USA: Elsevier Saunders; 2012; 1308-17.

24. Ramírez-Crescencio MA, Velásquez-Pérez L. Epidemiology and trend of neurological diseases associated to HIV/AIDS. Experience of Mexican patients 1995-2009. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013; 115:1322-5.

25. Ortega-Pacheco A, Acosta Viana KY, Guzmán-Marín E, Segura-Correa JC, Alvarez-Fleites M, Jiménez-Coello M. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in fattening pigs farm from Yucatán, México. *Biomed Res Int*. 2013; 1-6.
26. García-Vazquez Z, Rosario-Crus R, Díaz-García G, Hernández-Baumgarten O. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, swine and goats in four Mexican states. *Prev Vet Med*. 1993; 17: 127-32.
27. Hernández-Cortazar IB, Acosta-Viana KY, Guzmán-Marín E, Ortega-Pacheco A, Torres-Acosta JF, Jimenez-Coello M. Presence of *Toxoplasma gondii* in pork intended for human consumption in tropical Southern Mexico. *Foodborne Pathog Dis*. 2016; 13: 695-9.
28. Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. 5th ed. Philadelphia, USA: Saunders Elsevier; 2008.
29. Barnes PD. Brain Imaging. In: Blickman JG, Parker BR, Barnes PD. *Pediatric Radiology-The Requisites*. 3rd ed. Philadelphia, USA: Mosby Elsevier; 2009; 227.
30. Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortíz-Cortés J, Ortega-Velázquez V, Galván-Ramírez M de L, Ruiz-García M, Saltigeral-Simental P, Ordaz-Favila JC, Sánchez C, Correa D. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72: 142-4.
31. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. 1999; 353: 1829-33.
32. Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*. 1992; 359:82-5.
33. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 5844-9.
34. Ferreira IM, Vidal JE, de Mattos C de C, de Mattos LC, Qu D, Su C, Pereira-Chiocola VL. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol*. 2011; 129: 190-5.
35. Rico-Torres CP, Vargas-Villavicencio JA, Correa D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016; 35: 1079-88.
36. Rico-Torres CP, Figueroa-Damián R, López-Candiani C, Macías-Avilés HA, Cedillo-Peláez C, Cañedo-Solares I, Luna-Pastén H, Técuatl-Herrada BL, Correa D. Molecular

diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31: 411-3.

37. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004; 363: 1965-1976.
38. Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.* 2007; 29: 651-60.
39. Contreras-Ochoa CO, Lagunas-Martínez A, Belkind-Gerson J, Correa D. 2012. *Toxoplasma gondii* invasion and replication in astrocyte primary cultures and astrocytoma cell lines: systematic review of the literature. *Parasitol. Res.* 110: 2089-94.
40. Correa D, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Becerra-Torres E, Olmedo-Hernández M, Medina-Escutia ME, Murrieta S, Hernández-Islas JL. Immunobiology of congenital toxoplasmosis. En: Terrazas LI. *Advances in the immunobiology of parasitic diseases.* Kerala, India: Research Signpost; 2007; 199-224.
41. Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, Rico-Torres CP, Sahagún-Ruiz A, Medina-Escutia ME, Correa D. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immun.* 2010; 11: 363-73.
42. Suzuki Y, Yang Q, Yang S, Nguyen N, Lim S, Liesenfeld O, Kojima T, Remington JS. IL-4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis. *J Immunol.* 1996; 157: 2564-9.
43. Kasper LH, Matsuura T, Khan IA. IL-17 stimulates protective immunity in mice against the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1995; 155: 4798-804.
44. Adams LB, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol.* 1990; 144: 2725-9. ^[17]_[SEP]
45. Bohne W, Hessemann J, Gross U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun.* 1994; 62: 1761-7.
46. Chao CC, Gekker G, Hu S, Peterson PK. Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1994; 152: 1246-52.
47. Scharon-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med.* 1997; 185: 1261-73.
48. Iqbal J, Al-Awadhi MA, Raghupathy RG. TGF-beta1 levels and intraocular tissue alterations in mice infected with a virulent type I RH *Toxoplasma gondii* strain. *Exp Parasitol.* 2016; 162: 57-63.

49. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin Microbiol Rev. 1998; 11: 569-88.
50. Alexander J, Jebbari H, Bluethmann H, Brombacher F, Roberts CW. The role of IL-4 in adult acquired and congenital toxoplasmosis. Int J Parasitol. 1998; 28: 113-20.
51. Nickdel MB, Roberts F, Brombacher F, Alexander J, Roberts CW. Counter-protective role for interleukin-5 during acute *Toxoplasma gondii* infection. Infect Immun. 2001; 69: 1044-52.
52. Anderson BL, Gonik B. Perinatal Infections. En: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC. Neonatal-perinatal medicine: diseases of the fetus and infant. 9th ed. St Louis Missouri, USA: Mosby Elsevier; 2010; 417-8.
53. Baquero-Artigao F, del Castillo-Martín F, Fuentes-Corripio I, Goncé Mellgren A, Fortuny Guasch C, de la Calle Fernández-Miranda M, González-Tomé MI, Couceiro Gianzo JA, Neth O, Ramos Amador JT; Grupo de Trabajo de Infección Congénita y Perinatal de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). Guía de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica para el diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis congénita. An Pediatr (Barc). 2013; 79: 116-e1-116.e16.
54. Saltigeral-Simental P, Becerra-Aquino AG, Mascareñas de los Santos CO. Toxoplasmosis congénita. En: González-Saldaña N, Saltigeral-Simental P, Macías-Parra M. Infectología neonatal. Cd México: McGraw Hill Interamericana; 2006; 301-6.
55. Couvreur J, Desmots G, Tournier G, Szusterkac M. A homogeneous series of 210 cases of congenital toxoplasmosis in 0 to 11-month-old infants detected prospectively, Ann Pediatr (Paris). 1984; 31: 815-9.
56. Cortina-Borja M, Tan HK, Wallon M, Paul M, Prusa A, Buffolano W, Malm G, Salt A, Freeman K, Petersen E, Gilbert RE; European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. PLoS Med. 2010; 7: 1-11.
57. Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL. Feigin & Cherry's Textbook of pediatric infectious diseases. 2nd vol. 6th ed. Philadelphia, USA: Saunders Elsevier; 2009.
58. González SN, Saltigeral SS. Guía de antimicrobianos, antivirales, antiparasitarios, antimicóticos e inmunomoduladores. 8a ed. Cd México: Nieto Editores; 2008.
59. Arce-Estrada GE, Gómez-Toscano V, Cedillo-Peláez C, Sesman-Bernal AL, Bosch-Canto V, Mayorga-Butrón JL, Vargas-Villavicencio JA, Correa D. Report of an unusual case of anophthalmia and craniofacial cleft in a newborn with *Toxoplasma gondii* congenital infection. BMC Infect Dis. 2017; 17: 459.

60. Tan DH, Asztalos E, Douglas D, Read S, Biltnum A. Congenital transmission of human immunodeficiency virus, cytomegalovirus, and toxoplasmosis in premature infant. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28:1129-31.
61. Durlach R, Kaufer F, Carral L, Freuler C, Ceriotta M, Rodríguez M, Freilij H, Altchek J, Vázquez L, Corazza R, Dalla Fontana M, Arienti H, Sturba E, González Ayala S, Cecchini E, Salomon C, Nadal M, Gutiérrez N, Guarnera E. Argentine consensus of congenital toxoplasmosis. *Medicina (B. Aires).* 2008; 68: 75-87.
62. Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez M de L, Luna-Pastén H, Rodríguez Pérez LR, Ortiz-Alegría LB, Rico-Torres CP, Vela-Amieva M, Pérez-Andrade M, Figueroa-Damián R, Correa D. Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27: 469-74.
63. de Souza-e-Silva CH, Vasconcelos-Santos DV, de Andrade GQ, Carellos EV, de Castro Romanelli RM, de Resende LM, Januário JN, Carneiro M, de Aguiar Vasconcelos Carneiro AC, de Almeida Vitor RW. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013; 32: 13-6.