



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**“FENOTIPO DE LA
RESPUESTA INMUNE EN MENORES DE UN AÑO
CON INFECCIÓN CONGÉNITA POR
Toxoplasma gondii”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA**

**PRESENTA EL ALUMNO:
GABRIEL EMMANUEL ARCE ESTRADA**

**TUTORA:
DRA. MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN**

**ASESORES METODOLÓGICOS:
DRA. PATRICIA CRAVIOTO QUINTANA
FIS. MAT. FERNANDO GALVÁN CASTILLO**



CIUDAD DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 mi familia y a mis maestros.

Gracias por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado financieramente por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social-CONACYT, proyecto 139721 y realizado en el Instituto Nacional de Pediatría

ÍNDICE

MARCO TEÓRICO	5
<i>Aspectos biológicos</i>	5
<i>Epidemiología</i>	8
<i>Manifestaciones clínicas</i>	9
Infección adquirida	9
Infección congénita.....	10
<i>Diversidad genética del parásito, virulencia y cuadro clínico</i>	12
<i>Respuesta inmune</i>	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVO GENERAL	16
<i>Objetivos específicos</i>	16
HIPÓTESIS	17
ASPECTOS ÉTICOS	17
METODOLOGÍA	17
<i>Clasificación de la investigación</i>	17
<i>Estrategia del estudio</i>	17
<i>Confirmación de toxoplasmosis congénita</i>	19
<i>Pruebas de respuesta inmune</i>	20
Respuesta humoral	20
Respuesta celular	21
<i>Análisis estadístico</i>	22
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

MARCO TEÓRICO

Aspectos biológicos

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular obligado que infecta aproximadamente al 30% de la población, puesto que es uno de los parásitos más eficientes en la transmisión. Se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma: Reino *Protista*, Subreino *Protozoo*, Phylum *Apicomplexa*, Clase *Cocci*, Familia *Sarcocystidae*, Género *Toxoplasma*, Especie *Toxoplasma gondii* (1).

Su nombre fue propuesto por Nicolle y Manceaux en 1909, quienes lo descubrieron en tejidos del *Ctenodactylus gundi* (un roedor africano). Lo llamaron así por su morfología arqueada: “*toxon*” que significa arco, “*plasma*” forma y “*gondii*” por el roedor en que fue encontrado (2).

El ciclo de vida (figura 1) incluye dos vías de transmisión: la oral, que da lugar a infección denominada mundialmente como “adquirida”, y la vertical, o infección congénita. El parásito tiene reproducción sexual y asexual; la primera ocurre únicamente en el intestino delgado de los felinos (hospederos definitivos), mientras que la asexual puede ocurrir tanto en éstos como en otros animales de sangre caliente (hospederos intermediarios) (3). Los felinos se infectan mayormente por ingestión de presas vivas infectadas, o bien carne o agua contaminadas con bradizoitos o esporozoitos, que se encuentran en quistes tisulares (presentes en la carne) u ooquistes, respectivamente; éstos se excretan con sus heces (1 a 10 millones al día). Los carnívoros, omnívoros y carroñeros pueden infectarse de manera horizontal comiendo carne y otros alimentos infestados con quistes tisulares (4).

Una vez ingeridos, los esporozoitos o los bradizoitos invaden los enterocitos, donde se convierten en taquizoitos, que son las formas de replicación rápida (cada 6 a 10 horas) y agresivas, penetrando los tejidos circundantes y multiplicándose mediante un proceso denominado endodiogenia (5). Al salir de las células donde se replicaron, los taquizoitos causan lisis y necrosis tisular, por lo que en esta etapa (fase aguda) es cuando hay mayor daño. La respuesta inmune de los hospederos

inmunocompetentes detiene la replicación de los taquizoitos, algunos de los cuales se convierten en bradizoítos, que se replican lentamente y permanecen latentes, razón por la cual la infección por *T. gondii* es asintomática en el 80% de los casos. Esta infección considerada subclínica pero puede tener efectos sobre el comportamiento y otros procesos fisiológicos, por lo que actualmente ya no se considera tan inocua (6,7). Además, los portadores pueden presentar problemas clínicos graves si se reactiva la fase aguda debido a una inmunodepresión, por infección (VIH) o tratamiento inmunosupresor (en trasplantes, o enfermedades como cáncer (8).

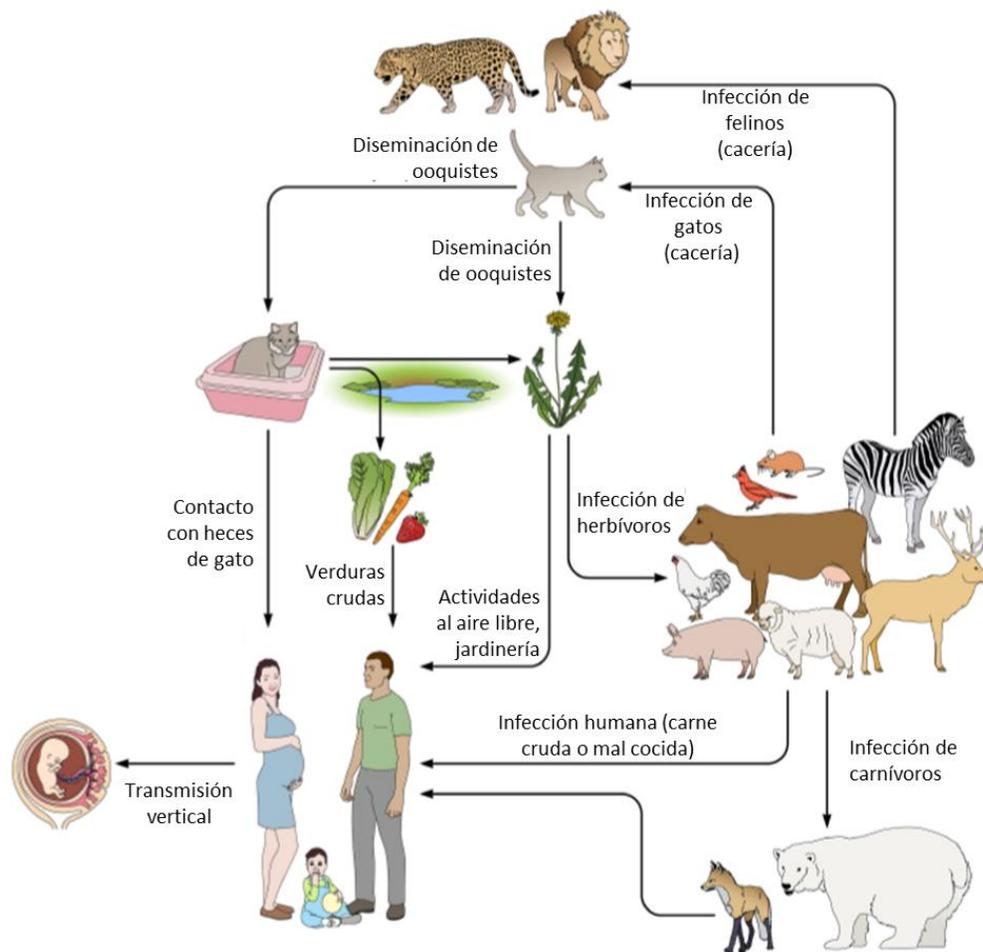


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Modificado de Robert-Gangneux y col. (9).

En cuanto a la toxoplasmosis congénita, la transmisión de la madre al hijo puede ocurrir por vía sanguínea-placentaria, aunque también se ha propuesto el paso de los taquizoitos a través del líquido amniótico por deglución fetal (10).

En 1999 se publicó un trabajo que ha sido paradigmático, pues en un estudio de una cohorte de mujeres embarazadas se demostró que el periodo de la gestación en que ocurre la infección materna es determinante para la transmisión y daño fetal (figura 2; 11). Las infecciones tempranas se asocian con tasas bajas de infección congénita pero mayor daño embrionario, y viceversa, de tal manera, que la mayoría de los fetos con infección congénita nacen sin problemas clínicos aparentes, aunque desarrollan secuelas posteriormente si no se les ofrece tratamiento profiláctico (12).

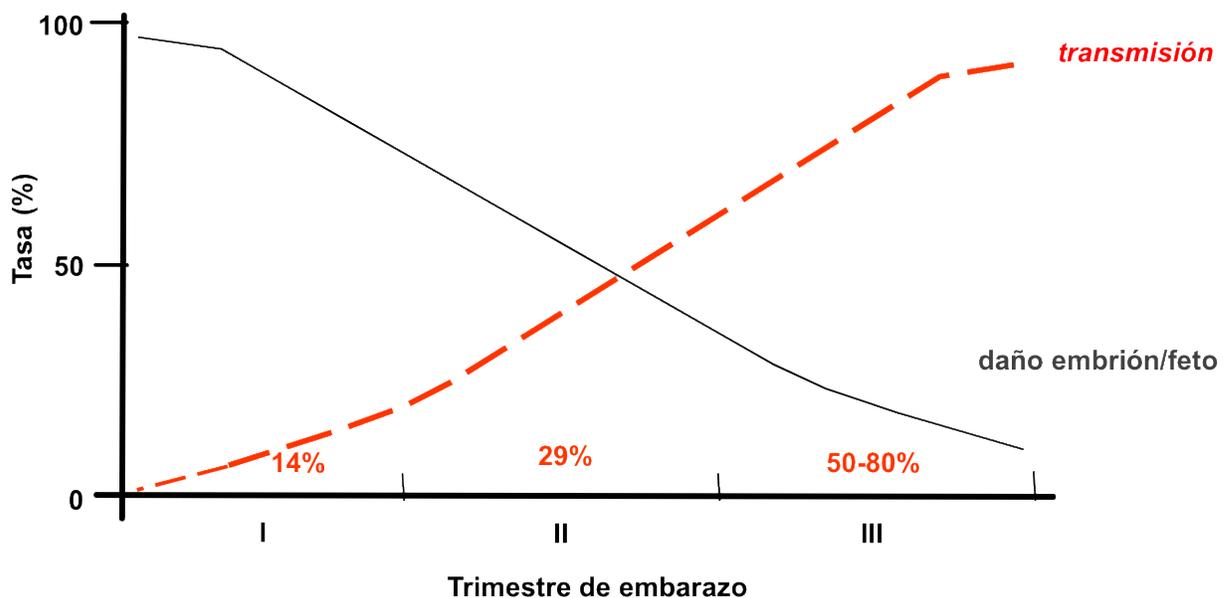


Figura 2. Transmisión vertical de *T. gondii* y daño fetal, de acuerdo al tercio de gestación en el que se infecta la madre en humanos. Modificado de Dunn y col. 1999 (11).

Epidemiología

Toxoplasma gondii está presente en el 30% de los seres humanos a nivel mundial, pero puede llegar a ser de 80% en algunos países o regiones (13). La infección se observa con mayor frecuencia en zonas cálidas y húmedas que en áreas frías o calientes-secas (5). En México se estima una seroprevalencia de un 40.0% a un 43.9% (14). Se ha encontrado una prevalencia superior en los estados costeros y en los adultos que en el centro del país y en niños; en los 21 estados donde la temperatura ambiental es mayor, la prevalencia es más alta (figura 3).

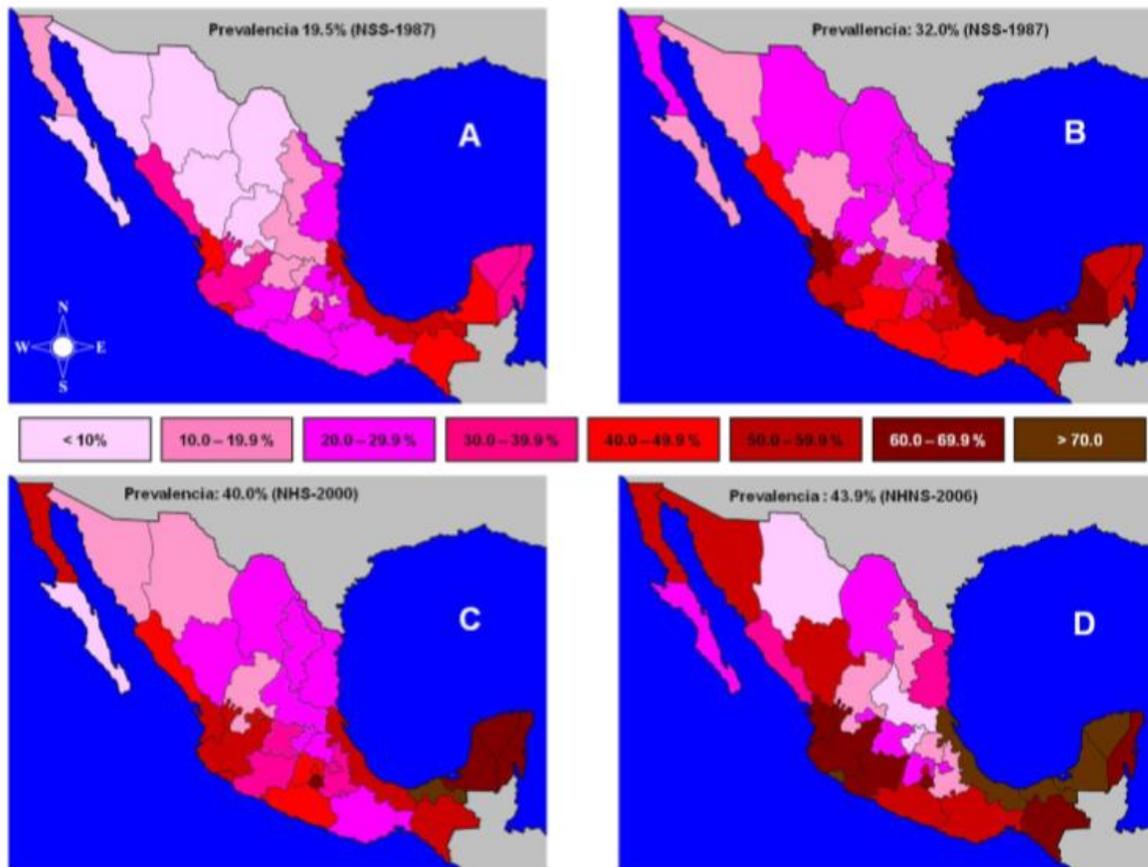


Figura 3. Mapa de México, donde se muestran los rangos de prevalencia de anticuerpos anti-T. gondii por Estado, en la Encuesta Nacional Seroepidemiológica de 1987, la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA 2000) y la Encuesta del Sistema Nacional de Salud y Nutrición (NHNS-2006). En estos últimos estudios, los valores de prevalencia se ajustaron teniendo en cuenta la sensibilidad y especificidad para el ELISA. Los rangos de prevalencia están indicados por las diferentes tonalidades de colores. Tomado y modificado de Caballero y col. 2012 (14).

En relación a la toxoplasmosis congénita, en nuestro país sólo hay un estudio publicado en 2005), en el cual se reportaron dos casos por cada 1000 nacidos vivos del valle de México (figura 4), frecuencia muy alta al compararse con otras en el mundo, como Estados Unidos, donde la incidencia se calcula entre 1 de cada 1000 y 1 de cada 8000 nacidos vivos (5,15).

Manifestaciones clínicas

Infección adquirida

Los niños quienes adquieren la infección por *T. gondii* después de nacer y cuentan con un sistema inmune funcional, generalmente no presentan síntomas reconocibles clínicamente. En caso de presentarlos, se pueden manifestar como fiebre, retinocoroiditis, rigidez de nuca, mialgias, artralgias, exantema maculopapular que respeta las palmas y plantas, adenomegalias, hepatoesplenomegalia, hepatitis, linfocitosis, meningitis, absceso cerebral, encefalitis, confusión, neumonía, polimiositis, pericarditis, derrame pericárdico y miocarditis. La manifestación más común de la toxoplasmosis adquirida es el aumento de tamaño de uno de los ganglios linfáticos cervicales. Casi todos los casos se recuperan espontáneamente.

A nivel ocular, las manifestaciones clínicas comprenden visión borrosa, miodesopsias, fotofobia, epifora, estrabismo, microoftalmia, microcórnea, cataratas, anisometropía, nistagmo, glaucoma, neuritis óptica y atrofia óptica.

En pacientes inmunocomprometidos (por SIDA, neoplasias, citotóxicos, esteroides, inmunosupresores) la infección diseminada afecta al sistema nervioso central en un 50% de los casos y puede afectar también al corazón, pulmones y tubo digestivo (8).

Se han encontrado alelos de los genes *HLA-DQ3*, *ABC4R*, *P2X7R*, *NALP1*, *TLR9* y *ERAAP*, asociados con susceptibilidad y riesgo de gravedad en la toxoplasmosis (5).

Infección congénita

La toxoplasmosis congénita puede manifestarse como una enfermedad neonatal leve o grave; aproximadamente el 90% de los niños infectados son asintomáticos al nacer. El mecanismo fisiopatológico fetal es muy similar al que ocurre en el adulto, el cual se basa en la destrucción celular y respuesta inflamatoria. De la misma manera, pueden formarse quistes con bradizoitos y permanecer latentes toda la vida, pero es común que se generen secuelas oculares y cerebrales más tarde en la vida (16).

Entre el 25-30% de los neonatos que presentan enfermedad clínicamente evidente al nacer, son prematuros. Además se pueden producir retraso en el crecimiento intrauterino, puntajes bajos por escala de Apgar e inestabilidad en el control térmico. Otras manifestaciones sistémicas incluyen la presencia de adenopatías, neumonitis, síndrome nefrótico, hepatoesplenomegalia, miocarditis, y síntomas más inespecíficos como problemas de succión, vómito y diarrea. Pueden encontrarse bandas radiolúcidas a nivel de las metafisis e irregularidad en las epífisis a nivel de la línea de calcificaciones provisional, sin observarse reacción perióstica, tanto en las costillas, como en los fémures y en las vértebras. Las manifestaciones cutáneas incluyen erupciones e ictericia y/o petequias por trombocitopenia; también pueden aparecer equimosis o incluso grandes hemorragias. El exantema puede ser fino y puntiforme, maculopapular difuso, lenticular, también encontrarse de color rojo oscuro, macular muy definido o papular azulado difuso. La afección del sistema endocrino puede ser por afección hipotalámica, hipofisaria o por afectación de las glándulas diana. Estas manifestaciones son poco frecuentes. Pueden presentarse mixedema, hipopituitarismo parcial anterior, pubertad precoz e hipernatremia con diabetes insípida central.

A nivel neurológico, las manifestaciones pueden abarcar desde síndromes neurológicos sutiles, hasta una encefalopatía aguda masiva. Es importante considerar a la toxoplasmosis como etiología potencial ante cualquier trastorno neurológico (especialmente si presenta lesiones retinianas) en menores de 1 año. Podemos encontrar a la hidrocefalia como la única manifestación neurológica. En

cuanto a las convulsiones, los patrones son muy variados: crisis focales, crisis de ausencias y tónico clónicas generalizadas, fasciculaciones, opistótonos e hipsarritmia. La parálisis de las extremidades, alteraciones en la deglución y dificultad respiratoria pueden ponerse de manifiesto por afectación medular o bulbar. Aunque algunos lactantes con microcefalia secundaria a toxoplasmosis congénita tratada tienen una función cognitiva normal o superior, la mayoría de ellos presentan daño cerebral grave. Si no se da tratamiento oportuno, algunos niños con infección congénita subclínica presentan alteraciones intelectuales.

Las calcificaciones tienen predilección por aparecer a nivel del núcleo caudado, ganglios basales, plexo coroideo y región subependimaria, aunque pueden desarrollarse en cualquier parte del cerebro. La tomografía cerebral las detecta, determina el tamaño ventricular y demuestra estructuras porencefálicas quísticas.

La infección congénita por *T. gondii* causa retinitis necrosante focal. Puede ocasionar desprendimiento retiniano. El nervio óptico y las vías de la visión pueden ser dañados. En asociación con las lesiones retinianas graves y las vitritis, puede aparecer una uveítis anterior y en ocasiones producir eritema del ojo externo. Otros hallazgos oculares son células y proteínas en la cámara anterior, grandes precipitados queratínicos, sinequias posteriores, nódulos en el iris y formaciones neovasculares en la superficie de éste, a veces con aumento de la presión intraocular y glaucoma.

Otras manifestaciones comprenden el estrabismo, nistagmo, alteraciones visuales y microoftalmia. Puede producirse una pérdida auditiva neurosensorial. La infección congénita en lactantes infectados por VIH es rara y puede comportarse como una enfermedad grave y fulminante con importante afección del sistema nervioso central, o cursar únicamente con déficit neurológico focal o manifestaciones sistémicas como neumonitis, que se asocia a depleción de CD4+. El 25-50% de los que no realizan tratamiento antirretroviral experimentan en algún momento encefalitis toxoplásmica que es mortal sino se trata (6).

Por lo menos el 50% de los bebés con toxoplasmosis congénita presentan hiperproteíorraquia >1 gr/dL y otras anomalías en el líquido cefalorraquídeo como producción local de IgM e IgG anti-toxoplasma (5).

Diversidad genética del parásito, virulencia y cuadro clínico

La virulencia de *T. gondii* es uno de los factores clave que definen su patogenicidad, relacionándose directamente con la capacidad para adherirse e invadir células y tejidos, dividirse y causar lisis celular. Originalmente se describieron tres linajes genéticos de *T. gondii* de acuerdo con la población clonal que existe en América del Norte y Europa, denominados tipos I, II y III (17). Los aislamientos del linaje I se consideran los más virulentos en ratones y suelen ser más frecuentes en casos clínicamente activos de toxoplasmosis humana. Los patógenos de tipo II y III son menos virulentos o de virulencia intermedia para ratones y han sido aislados de humanos, animales domésticos y silvestres. Las cepas virulentas exhiben un alto grado de crecimiento y una capacidad superior de migración a través de las barreras epiteliales en comparación con las cepas poco virulentas (18). Las cepas tipo II son las predominantes en Europa, Estados Unidos y Canadá y son menos virulentas.

En la toxoplasmosis congénita están emergiendo resultados que sugieren una relación entre la variante de *T. gondii* y el cuadro clínico: mediante una revisión sistemática de la literatura, se encontró que las cepas tipo I o atípicas se asocian con problemas clínicos graves, mientras que las tipo II y III se presentan en casos que nacen asintomáticos (19).

En México, los estudios sobre diversidad genética de *T. gondii* son escasos. Se han tipificado principalmente a partir de animales domésticos y salvajes del valle de México, Hidalgo, Colima y Durango. Los haplotipos encontrados son predominantemente clásicos (I, II, III o recombinantes de éstos), pero se han demostrado alelos atípicos de algunos genes (22,23). Recientemente, en el INP se demostró que la mayoría de las cepas que infectan en el del Valle de México son tipo I, y que en cinco de nueve binomios madre/hijo había infección por dos cepas

distintas y todos estos neonatos presentaron problemas clínicos (22). Este fenómeno no se había encontrado antes, y puede tener repercusiones en cuanto al manejo clínico de los pacientes.

Respuesta inmune

La respuesta inmune es crucial para el control de la toxoplasmosis. La primera es mediada por neutrófilos, macrófagos/monocitos, células dendríticas (DCs) y células asesinas naturales (NKs) que pueden identificar patrones moleculares asociados a patógenos, desencadenar la cascada inflamatoria y presentar los antígenos a los linfocitos, mediadores de la respuesta adquirida (figura 4) (23,24). La respuesta adaptativa limita la replicación de los taquizoítos durante la fase aguda de la infección y promueve el establecimiento de las formas latentes del parásito, desencadenando la fase crónica de la enfermedad.

En general, la respuesta con un perfil tipo 1 induce eventos efectoros que controlan la proliferación de los taquizoítos, esto es, la fagocitosis y la destrucción de parásitos por fijación de complemento a través de las subclases de anticuerpos IgG₁ e IgG₃, y citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (NKs) o de células infectadas directamente por los linfocitos CD8⁺. Este perfil se caracteriza por expresión elevada de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12; aunque es efectiva para destruir a los taquizoítos, esta respuesta debe ser regulada por citocinas moduladoras como la IL-10 y el TGF- β , o por aparición de una respuesta secundaria tipo 2 (TH₂) mediada principalmente por IL-4, pues si no es así, se corre el riesgo de daño ocasionado por la propia reacción inflamatoria estimulada por una respuesta TH₁ exacerbada. Si la primera respuesta es de perfil 2, el parásito prolifera sin control y el paciente tiene un cuadro clínico grave (23). También se ha encontrado un papel importante de la respuesta TH₁₇, regulada por la interleucina 27 (25).

Hay poca evidencia del tipo de respuesta que producen los fetos y neonatos infectados congénitamente, si bien el decremento en la probabilidad de daño clínico al avanzar el momento de infección durante el embarazo, sugiere fuertemente que

la respuesta fetal juega un papel importante en el control del parásito, como en los casos de infección adquirida (figura 2) (11,23).

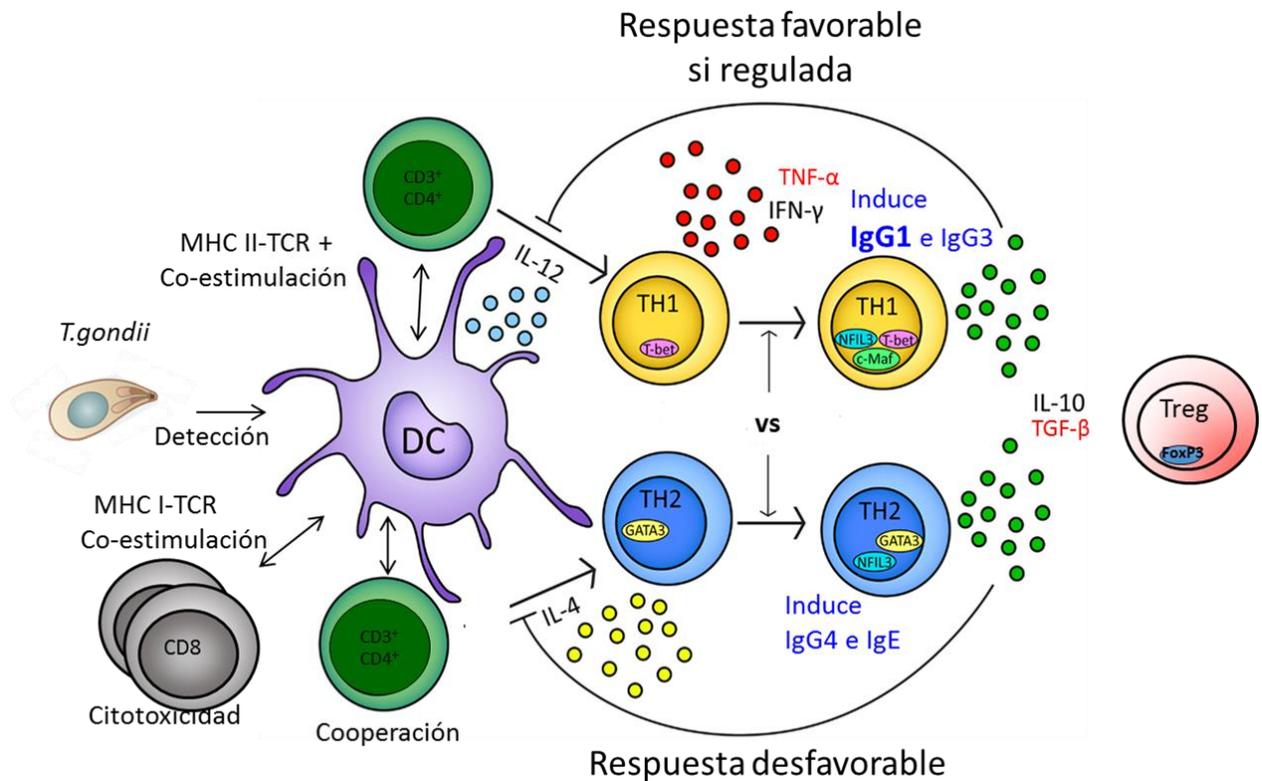


Figura 4. Mecanismos de respuesta inmune en la toxoplasmosis adquirida. Modificado de Correa y col., 2017 (26).

De hecho hay evidencia de que los bebés producen respuesta inmune humoral y celular (24-26). En la primera se fundamenta el diagnóstico de infección congénita: si el recién nacido produce anticuerpos de clase IgM o IgA, o de clase IgG contra antígenos diferentes a los de su madre (neo anticuerpos), se confirma la infección congénita (15). También se ha reportado que los neonatos pueden producir IFN- γ e IL-4 (27).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la literatura hay evidencia del papel de la virulencia de *Toxoplasma gondii* y el cuadro clínico en los recién nacidos con la forma congénita de la infección; particularmente se demostró en una revisión sistemática, que las cepas virulentas (tipo I) por un lado, pueden infectar en cualquier momento del embarazo a los embriones/fetos, y por el otro, que independientemente de este momento, causan problemas graves, contradiciendo los hallazgos de Dunn y *col.* (11), quienes realizaron su estudio en Europa, donde las cepas tipo II (no virulentas) son las más abundantes (19). En México se reportó recientemente que prevalecen las cepas tipo I (20). Además de la virulencia del parásito, pueden haber otros factores que determinan su efecto en el hospedero, como la dosis infectiva, el género, y otros factores genéticos (5,23,24). Entre estos factores están los que determinan la fuerza y el perfil de la respuesta inmune. Como se mencionó anteriormente, en la infección adquirida una respuesta tipo TH₁ regulada (por TGFβ o IL-10) se asocia con ausencia de manifestaciones clínicas graves. Hasta el momento, no se ha demostrado si el tipo de respuesta inmune del neonato se relaciona con las manifestaciones clínicas en una infección congénita por *T. gondii*, y si es el caso, cuál perfil de respuesta es el que se asocia con mal pronóstico.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los factores de la respuesta inmune del niño infectado congénitamente que se asocian a la presencia de manifestaciones clínicas en niños menores de un año con infección congénita por *Toxoplasma gondii*?

JUSTIFICACIÓN

Se han sugerido diferentes variables biológicas, como el genotipo del recién nacido, la respuesta inmune de la madre y la virulencia del parásito, entre otros, como factores que determinan que un niño infectado congénitamente por *T. gondii* desarrolle manifestaciones clínicas. Pero no hay estudios que determinen si existe relación entre la respuesta inmune del niño con el desarrollo de toxoplasmosis congénita, es decir, cuáles niños tenderán a enfermarse y el tipo de expresión clínica que se producirá. De ser así, esta información nos brindaría un apoyo al pronóstico temprano lo que facilitará proporcionar el tratamiento oportuno y *ad hoc* para cada caso.

OBJETIVO GENERAL

Describir en menores de un año con toxoplasmosis congénita la relación entre el perfil de respuesta inmune específica y la patología fetal.

Objetivos específicos

- Determinar el perfil de anticuerpos del menor de un año con infección congénita por *Toxoplasma gondii* y su relación con el cuadro clínico
- Determinar el perfil de citocinas y respuesta de linfocitos in vitro del menor de un año con infección congénita por *Toxoplasma gondii* y su relación con el cuadro clínico

HIPÓTESIS

Una respuesta TH₁ regulada (mediada por TGFβ e IL-10) se asociará con ausencia de manifestaciones clínicas graves.

ASPECTOS ÉTICOS

Este trabajo se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y contiene resultados parciales del proyecto INP-060/2011, aprobado por los Comités de Investigación, Ética en Investigación y de uso y cuidado de animales de laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Pediatría (INP). El Instituto Nacional de Perinatología (INPer) también aprobó el proyecto (número 212250-02231). Los tutores de los pacientes firmaron un consentimiento informado, que declaró explícitamente que el estudio era de bajo riesgo. Todos los niños fueron tratados clínicamente en el INP, también de acuerdo con los estándares nacionales e internacionales.

METODOLOGÍA

Clasificación de la investigación

Estudio prospectivo, observacional, transversal y analítico.

Estrategia del estudio

En la figura 5 se muestra un diagrama de flujo con la estrategia general de esta tesis. Se incluyeron 28 casos de toxoplasmosis congénita confirmada en niños menores de un año, de ambos géneros, que están incluidos en una serie de 30 casos (Gomez-Toscano y col., aceptado en Acta Pediátrica de México).

Los pacientes del estudio fueron reclutados a través de un programa de tamizaje prenatal, otro de tamizaje postnatal y el resto llegaron referidos de otras unidades de salud como casos sospechosos.

En el cuadro 1 se resumen los hallazgos clínicos, de acuerdo con el tipo de reclutamiento. Como puede observarse hubo más niños que niñas; un diagnóstico y tratamiento más tempranos derivaron en mayor edad gestacional y mayor peso al nacer. Las manifestaciones clínicas fueron ictericia, hepatomegalia, esplenomegalia, retinocoroiditis, hipoacusia, espasticidad, calcificaciones cerebrales, hidrocefalia, microcefalia y retraso en el neurodesarrollo. De acuerdo con estas manifestaciones, los casos se clasificaron por gravedad de la enfermedad en leve, moderado y grave; asimismo, de acuerdo con la localización, en neurológica, neurooftálmica y diseminada.

Clasificamos algunas manifestaciones poco frecuentes en cuatro grupos:

- *Otras manifestaciones neurológicas:* Dolicocefalia, megacisterna magna, crisis convulsivas, potenciales visuales alterados, atrofia cerebral, implantación auricular baja, hiperproteorraquia, macrocefalia, asimetría ventricular cerebral, actividad epiletiforme, hemorragia intracraneal.
- *Otras manifestaciones sistémicas:* Adenomegalias generalizadas, anemia, trombocitopenia, leucopenia, hendidura oblicua facial completa izquierda, atresia de coanas bilateral, peso bajo para la edad gestacional, prematuridad, colestasis, calcificaciones intrahepáticas, ascitis, exantema.
- *Otros hallazgos:* Dacriostenosis, persistencia conducto arterioso, desnutrición, acortamiento de extremidades, macrosomía, comunicación interventricular, comunicación interauricular, hernia umbilical, sinostosis sagital y coronal, criptorquidia, reflujo gastroesofágico, diabetes insípida, estenosis hipertrófica de píloro, higroma subdural bilateral, hidrocele, foramen oval permeable, hipoplasia cerebelosa, cabeza en gota, microretrognatia, hidropesía fetal.

- **Comorbilidades:** Infección por VIH, acidosis tubular renal, trisomía 18, coinfección por citomegalovirus, púrpura fulminante secundaria a déficit de proteína C.

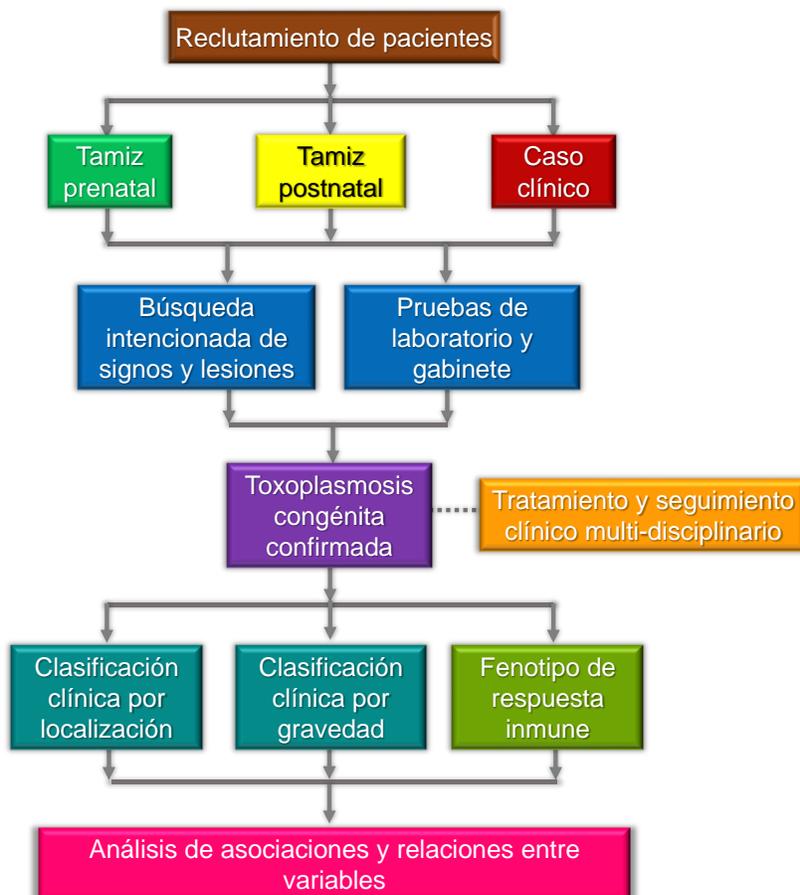


Figura 5. Estrategia del estudio

Confirmación de toxoplasmosis congénita

El diagnóstico se basó en exploración física, pruebas de gabinete y laboratorio. El servicio de Infectología fue encargado de realizar la exploración física inicial (con búsqueda intencionada de hepatoesplenomegalia, ictericia, adenomegalias, hidrocefalia y microcefalia) y dar el tratamiento a los niños a quienes se les confirmó el diagnóstico de toxoplasmosis congénita. La exploración neurológica fue descrita por el servicio de Neurología. Se valoró el fondo de ojo para descartar

retinocoroiditis y otras manifestaciones oculares en el servicio de Oftalmología. Se realizó valoración por Audiología para cuantificar el grado de hipoacusia de quienes la presentaron. La gravedad del retraso en el neurodesarrollo fue medida en el Laboratorio de Seguimiento del Neurodesarrollo. En casos específicos, solicitamos valoración por Cirugía General, Cirugía Plástica, Gastroenterología y Nutrición, Endocrinología, Cardiología, Neurocirugía, Urología y Nefrología. Se realizaron pruebas de imagen (ultrasonido transfontanelar, tomografía y resonancia magnética de cráneo) como abordaje diagnóstico de infección congénita por agentes del grupo TORCH.

El diagnóstico de la infección congénita se apoyó también en pruebas de laboratorio, tanto serológicas como moleculares; se confirmó cuando hubo: a) un aumento en los títulos de anticuerpos específicos de clase IgG en muestras consecutivas; b) persistencia de la respuesta inmune durante más de diez meses; c) un título de anticuerpos en el recién nacido mayor que en la madre; d) presencia de anticuerpos IgM y/o IgA específicos; e) bandas específicas reconocidas por los anticuerpos IgG del neonato en western blot y ausentes en la madre (neo-anticuerpos); f) presencia del DNA parasitario en sangre del bebé y, g) bioensayo en ratón. La mayoría de los casos cumplieron con al menos con dos criterios. Las pruebas fueron ELISA, western blot y PCR; todas previamente estandarizadas y validadas (15,20,28). En todos los casos se realizó diagnóstico diferencial para infección por citomegalovirus por PCR en tiempo real, usando un kit comercial.

Pruebas de respuesta inmune

Respuesta humoral

El perfil de la respuesta inmune humoral se realizó por medio de ELISA indirecto, para las cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y de clase IgA, de acuerdo a lo reportado por Cañedo-Solares y col. (29,30). Brevemente se cubrieron placas de ELISA con antígeno de *T. gondii*, y, después de bloquear con albúmina, se añadieron los sueros, y a continuación los anticuerpos específicos de IgA o de las subclases de IgG (en pozos separados) conjugados con peroxidasa. Finalmente

se revelaron las reacciones con el sustrato de la enzima y se leyó la intensidad del color (absorbancia) en un lector de placas de ELISA.

Los resultados se reportan como índices de reactividad (IR), que se calcularon dividiendo la absorbancia de cada muestra problema entre el promedio más 3 desviaciones estándar de la absorbancia de tres controles negativos; se consideró positivo un $IR \geq 1.0$.

Respuesta celular

Se midió la proliferación celular de las fracción mononuclear periférica de la sangre de los pacientes (PBMC), por medio de citometría de flujo, posterior a su marcaje con un fluorógeno (CFSE) y estimulación con antígeno de *T. gondii* durante durante 72 h para la detección de citocinas, y de 120 horas para los ensayos de proliferación celular a 37°C en condiciones de esterilidad y atmósfera de 5% de CO₂ / 95% de aire ambiente. Las PBMC marcadas con CFSE se tiñeron con los anticuerpos anti-CD3, CD4, CD8 o CD19 conjugados a fluorógenos. Se usaron el mitógeno concanavalina-A y el medio de cultivo sin antígeno como controles positivo y negativo, respectivamente. Después del período de estimulación, se realizó el análisis en un citómetro de flujo y se determinó el porcentaje de células que proliferaron en cada caso. El índice de reacción relativa se calculó dividiendo el porcentaje de proliferación de PBMC estimuladas con el antígeno, entre el porcentaje de proliferación de PBMC cultivadas en medio solo.

La concentración de citocinas en los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos de PBMC se cuantificó usando estuches comerciales de perlas, para perfil inflamatorio y para perfil TH₁/TH₂, así como para el TGF- β individual. El IR para cada citocina probada se calculó dividiendo la concentración de citocina de las PBMC estimuladas con el antígeno entre la concentración de la misma citocina producida por las PBMC no estimuladas.

Análisis estadístico

Se determinó la significancia estadística de las diferencias en intensidad (IR) de la respuesta inmune humoral y celular entre grupos clínicos mediante la U de Mann Whitney o Kruskal-Wallis para dos o más grupos, respectivamente. Las asociaciones entre las variables clínicas entre sí y con las variables inmunológicas dicotomizadas se midieron con la razón de momios, usando la χ^2 o Fisher exacta como prueba de hipótesis. La correlación (Rho) entre variables numéricas se midió con la prueba de Spearman. En todos los casos, consideró significancia estadística si la *P* era menor o igual a 0.05, aunque se muestran resultados con $P < 0.1 > 0.05$ que tuvieron alguna tendencia biológica o clínica con fines de discusión.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran las manifestaciones clínicas clasificadas de acuerdo con la forma de reclutamiento en menores de un año infectados congénitamente por *Toxoplasma gondii*. Los niños captados por el programa de *tamizaje prenatal* -cuyas madres recibieron tratamiento contra toxoplasmosis en el embarazo- mostraron las manifestaciones clínicas más leves que los bebés de los otros grupos. Los antecedentes obstétricos incluyeron preeclampsia, restricción de crecimiento intrauterino, amenaza de aborto o parto pretérmino, sufrimiento fetal, oligoamnios, hidrocefalia, hidropesía fetal, polihidramnios, displasia ósea, holoprosencefalia, y labio y paladar hendidos. La dacriostenosis bilateral fue encontrada en un caso de este grupo (no mostrada en el cuadro).

Los bebés captados por *tamizaje postnatal* tuvieron manifestaciones clínicas en mayor cantidad y gravedad en comparación al grupo previo. Entre ellas destacan las descritas en el cuadro, además de atrofia cerebral, linfadenopatías, alteración de la vía visual y atrofia cerebral, exantema petequial, uveítis, hemorragia subhialoidea, así como hemorragia subretiniana o intracraneal. Los hallazgos que

se reportaron prenatalmente fueron hematoma placentario, preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino, hidrocefalia y oligoamnios.

Los niños que se integraron a nuestro estudio referidos de otras unidades de salud por sospecha clínica, es decir, como *casos clínicos*, presentaron las manifestaciones clínicas más evidentes y con peor pronóstico. Otras manifestaciones presentes, no incluidas en el cuadro fueron: atrofia cerebral, implantación auricular baja, extremidades hipotróficas, asimetría ventricular, crisis convulsivas, alteración de la vía visual, hendidura oblicua facial, atresia de coanas, anoftalmia, megacisterna magna, microftalmia, cataratas, leucopenia, trombocitopenia, anemia, disgenesia oftálmica, microftalmia, hiperproteínorraquia, esclerización retiniana, atrofia retiniana, cataratas, microcórnea, coloboma, calcificaciones intraoculares e intrahepáticas, uveítis bilateral, desprendimiento retiniano, hemorragias subcoroideas, colestasis, macrocefalia, hidrops fetalis, ascitis, coloboma de nervio óptico, holoprocefalia, colpocefalia, agenesia de cuerpo calloso, labio y paladar hendido, polidactilia, sindactilia, clinodactilia, comunicación interauricular, persistencia del conducto arterioso, lengua bífida, dolicocefalia, linfadenomegalias. Los antecedentes de la gestación también fueron los de mayor impacto: embarazo gemelar con involución de un gemelo, amenaza de parto pretérmino y aborto, preeclampsia, polihidramnios, oligoamnios, restricción de crecimiento intrauterino, hidrocefalia, hidropesía fetal, displasia ósea, holoprosencefalia, y labio y paladar hendidos.

Cuadro 1. Manifestaciones clínicas y clasificación de menores de un año con toxoplasmosis congénita, de acuerdo con el origen.

Origen del caso	n	Sexo M:F	Semanas de gestación al nacimiento	Peso al nacimiento (x̄ en g)	Ictericia	Hepatomegalia	Esplenomegalia	Retinocoroiditis	Hipoacusia	Espasticidad	Calcificaciones cerebrales	Hidrocefalia/microcefalia	Retraso del neurodesarrollo	Localización de las manifestaciones clínicas	Gravedad de la infección
Tamiz prenatal	5	4:1	39	3051	40%	20%	0%	0%	20%	40%	0%	0%	Leve 100% (4/4)	100% Neurológico	100% Leve
Tamiz postnatal	5	4:1	38	2431	20%	40%	40%	0%	20%	60%	0.4%	40%	Leve 40%, moderado 40%, grave 20%	40% neurológico, 60% diseminado	60% leve, 40% moderado/grave
Caso clínico	18	1:1	35	2612	44%	50%	27%	44%	27%	5%	5%	44%	Leve 22%, moderado 11%, grave 62%, sin clasificar 5%	5% neurológico, 27% neurooftálmico, 68% diseminado	11% leve, 89% moderado/grave

La mayoría de los niños tuvieron retraso del neurodesarrollo (Cuadro 2). La mitad de los pacientes presentaron otras manifestaciones neurológicas y/o otros problemas. Casi un 40% de los pacientes presentaron problemas oculares, ictericia y/o hepatomegalia. Los síntomas y signos menos comunes fueron hipoacusia, esplenomegalia, espasticidad, hidrocefalia, calcificaciones cerebrales, otras comorbilidades y microcefalia. Cinco casos fueron defunciones. Es importante enfatizar que el 64% de los niños fueron productos de embarazos de alto riesgo.

Cuadro 2. Frecuencia de manifestaciones clínicas en menores de un año con toxoplasmosis congénita.

Manifestaciones clínicas	Frecuencia n= 28	Porcentaje (%)
Retraso del neurodesarrollo	23	82.1
Otras manifestaciones neurológicas	14	50.0
Otros hallazgos	14	50.0
Otras manifestaciones sistémicas	12	42.9
Manifestaciones oculares totales	11	39.3
Ictericia	11	39.3
Hepatomegalia	11	39.3
Hipoacusia	9	32.1
Otras manifestaciones oculares	8	28.6
Esplenomegalia	7	25.0
Retinocoroiditis	7	25.0
Espasticidad	7	25.0
Hidrocefalia	7	25.0
Calcificaciones cerebrales	6	21.4
Defunción	6	21.4
Comorbilidades	5	17.9
Microcefalia	3	10.7

Al analizar la relación entre los aspectos clínicos y el antecedente de embarazo de riesgo, encontramos significancia estadística con la gravedad del cuadro y la misma tendencia, aunque no significativa, para manifestaciones clínicas específicas (Cuadro 3). Hubo menor peso al nacimiento, niveles mayores de IgG2 y evidencia

serológica de infección crónica (IgG de avidez alta) en los niños que nacieron de gestaciones de alto riesgo, en comparación con aquellos que no (Figura 6).

Cuadro 3. Relación y riesgo entre embarazo de riesgo y otras variables clínicas de niños menores de un año con toxoplasmosis congénita.

Variable	n	Embarazo de riesgo	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P
Gravedad	sí	18	14	77.8%	10.5	1.5-73.7
	no	8	2	25.0%		
Otras manifestaciones sistémicas	sí	12	10	83.3%	5.0	0.8-30.4
	no	16	8	50.0%		

La significancia estadística se determinó por medio de la Fisher exacta.

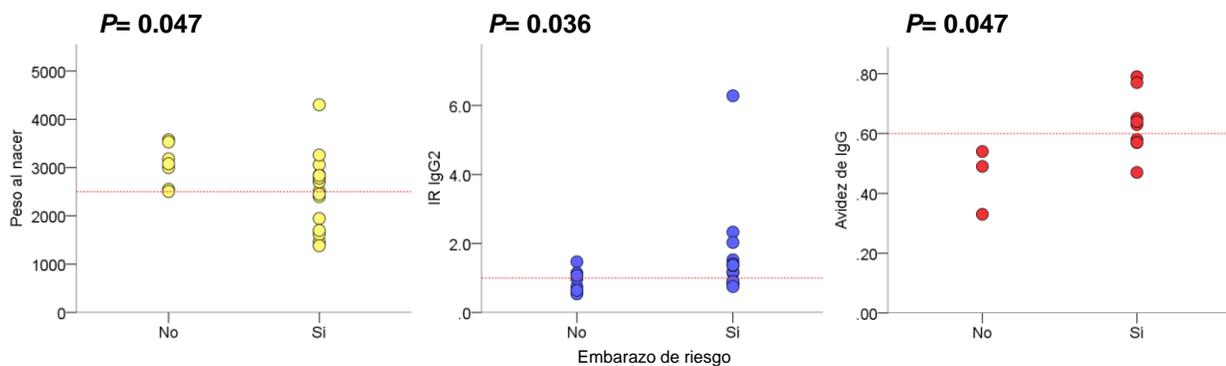


Figura 6. Relación entre el embarazo de riesgo con el peso al nacer de menores de un año con toxoplasmosis congénita, así como su producción de anticuerpos IgG2 y la avidez de la IgG. La línea roja punteada representa el punto de corte; cada punto corresponde a un caso. La significancia estadística se determinó por la prueba de U de Mann Whitney.

Las manifestaciones oculares en general, así como las lesiones diferentes a retinocoroiditis, se asociaron a la hipoacusia, al retraso del neurodesarrollo y la esplenomegalia, en algunos casos con significancia limítrofe (Cuadro 4). En contraste, la microcefalia se asoció a las manifestaciones oculares de manera negativa.

Cuadro 4. Asociación entre las manifestaciones oculares y otras variables clínicas en niños menores de un año con toxoplasmosis congénita.

Variable	n	Manifestaciones oculares totales		Frecuencia	RM	IC _{95%}	P
Hipoacusia	si	9	6	66.7%	5.5	1.0- 31.3	0.052
	no	19	5	26.3%			
Retraso del neurodesarrollo	si	23	11	47.8%	1.9	1.2-2.8	0.063
	no	5	0	0.0%			
Microcefalia	si	3	3	100.0%	0.3	0.2-0.6	0.005
	no	25	8	32.0%			

Variable	n	Otras manifestaciones oculares diferentes a retinocoroiditis		Frecuencia	RM	IC _{95%}	P
Hipoacusia	si	9	5	55.5%	6.7	1.1-40.4	0.044
	no	19	3	15.8%			
Esplenomegalia	si	8	4	50.0%	5.6	0.9-36.1	0.077
	no	20	3	15.0%			

La significancia estadística se determinó por medio de la Fisher exacta.

Se encontraron mayores niveles de algunas de las cuatro subclases de anticuerpos IgG en niños con manifestaciones oculares de manera global (figura 7), y específicamente con retinocoroiditis (figura 8) o con problemas oftalmológicos diferentes a retinocoroiditis (figura 9). También se observó mayor frecuencia de casos positivos a IgG3 en niños con manifestaciones oculares en general y aquellas diferentes a retinocoroiditis, que en los grupos de contraste, por lo que estos anticuerpos se encontraron como factores de riesgo (cuadro 5). Los de clase IgG2 se asociaron con significancia limítrofe a los problemas oculares.

Contrastan los hallazgos respecto a los niveles de IL-2 e IL-5 que fueron menores en los niños con problemas oculares, particularmente de aquellos sin retinocoroiditis, que en los niños sin estos problemas (Figuras 7 y 9).

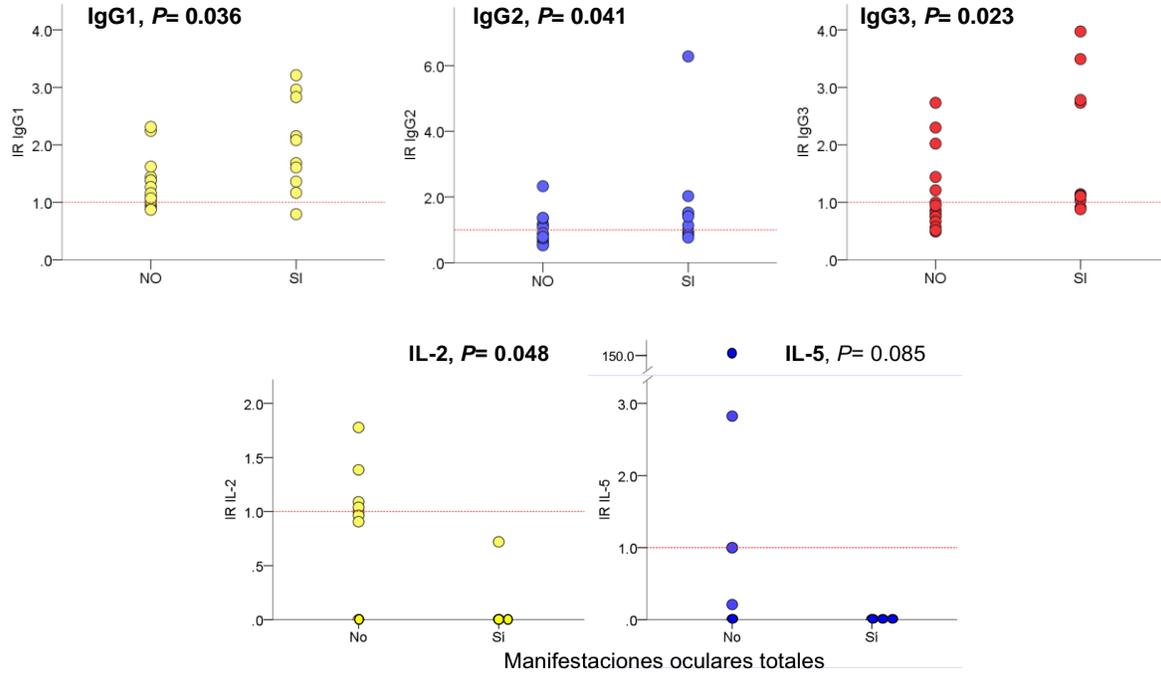


Figura 7. Comparación de la respuesta de anticuerpos IgG1, 2 y 3, así de IL-2 e IL-5 entre menores de un año con toxoplasmosis congénita con manifestaciones oculares y aquellos sin este problema clínico. La línea roja punteada representa el punto de corte; cada punto corresponde a un caso. La significancia estadística se determinó por la prueba de U de Mann Whitney.

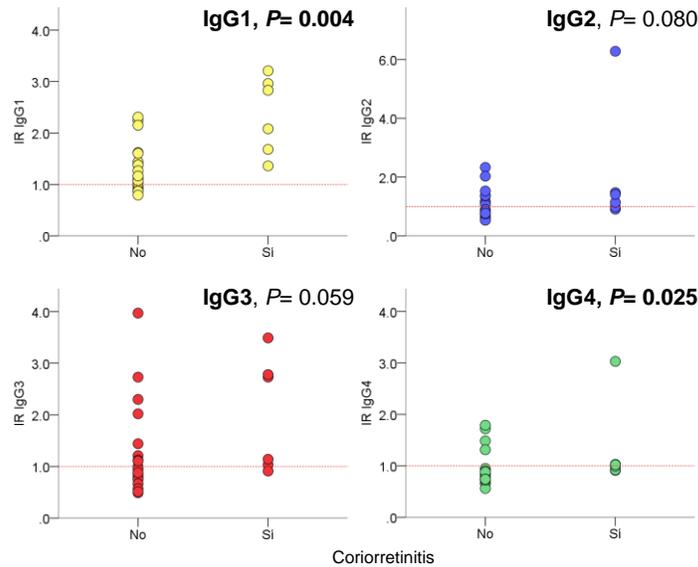


Figura 8. Comparación de la respuesta de anticuerpos IgG1, 2, 3 y 4 entre menores de un año con toxoplasmosis congénita con **corioretinitis** y aquellos sin este problema clínico. La línea roja punteada representa el punto de corte; cada punto corresponde a un caso. La significancia estadística se determinó por la prueba de U de Mann Whitney.

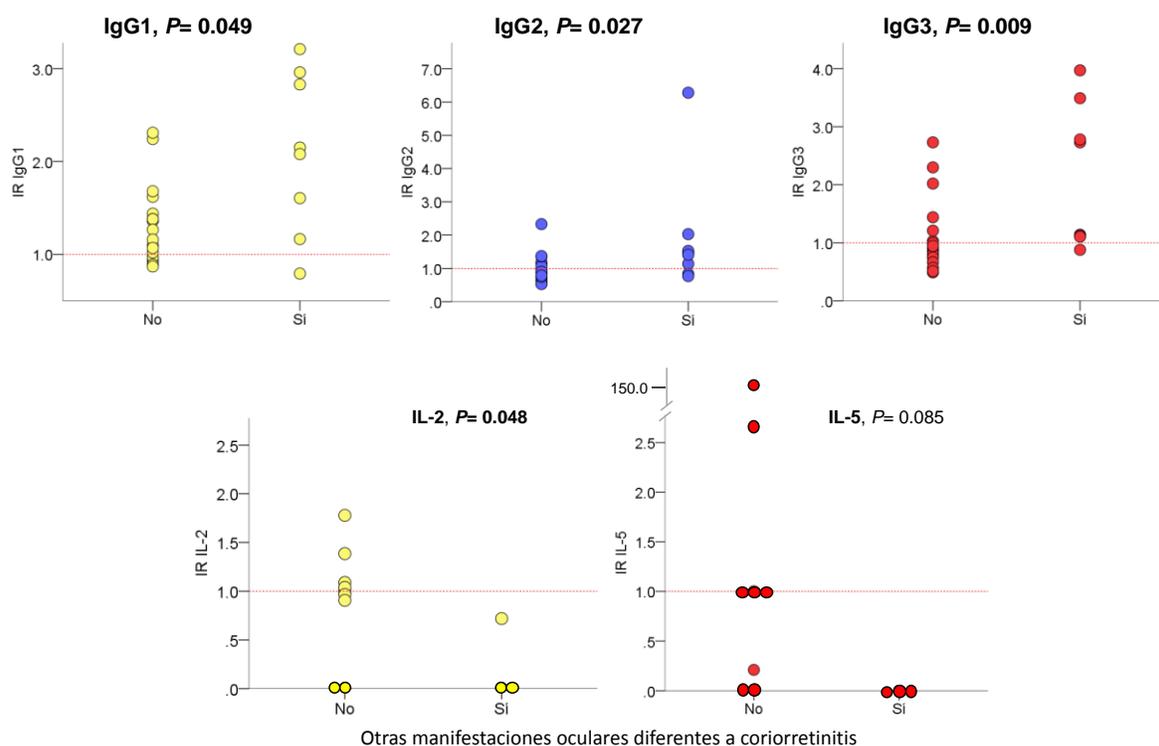


Figura 9. Comparación de la respuesta de anticuerpos IgG1, 2 y 3, así de IL-2 e IL-5 entre menores de un año con toxoplasmosis congénita con **manifestaciones oculares diferentes a coriorretinitis** y aquellos sin este problema clínico. La línea roja punteada representa el punto de corte; cada punto corresponde a un caso. La significancia estadística se determinó por la prueba de U de Mann Whitney.

Cuadro 5. Asociación entre las manifestaciones oculares y los anticuerpos de clase IgG2 e IgG3.

Variable	n	Manifestaciones oculares totales	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P
IgG3	pos	13	8	61.50%	8.0	1.2 - 25.7
	neg	12	2	16.70%		
Variable	n	Manifestaciones oculares diferentes a coriorretinitis	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P
IgG3	pos	8	7	87.5%	12.8	1.2 - 130.5
	neg	17	6	35.3%		
IgG2	pos	12	6	50.0%	5.5	0.8- 36.2
	neg	13	2	15.4%		

La significancia estadística se determinó por medio de la Fisher exacta.

La hipoacusia se asoció con microcefalia, esplenomegalia, hepatomegalia y otras manifestaciones neurológicas (cuadro 6). Hubo una asociación significativa entre el desarrollo de hipoacusia y la escasa producción de IL-2 (Figura 10); y hubo la misma tendencia en la IL-5, aunque no se encontró significancia estadística.

Cuadro 6. Asociación entre la hipoacusia y otras variables clínicas en niños menores de un año con toxoplasmosis congénita.

Variable	n	Hipoacusia	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P
Esplenomegalia	si	5	71.4%	10.6	1.5-76.1	0.020
	no	4	19.0%			
Microcefalia	si	3	100.0%	7.1	0.1-0.5	0.026
	no	6	24.0%			
Otras manifestaciones neurológicas	si	7	50.0%	6.0	1.0-37.3	0.052
	no	2	14.3%			
Hepatomegalia	si	6	54.5%	5.6	1.0-31.3	0.052
	no	3	17.6%			

La significancia estadística se determinó por medio de la Fisher exacta.

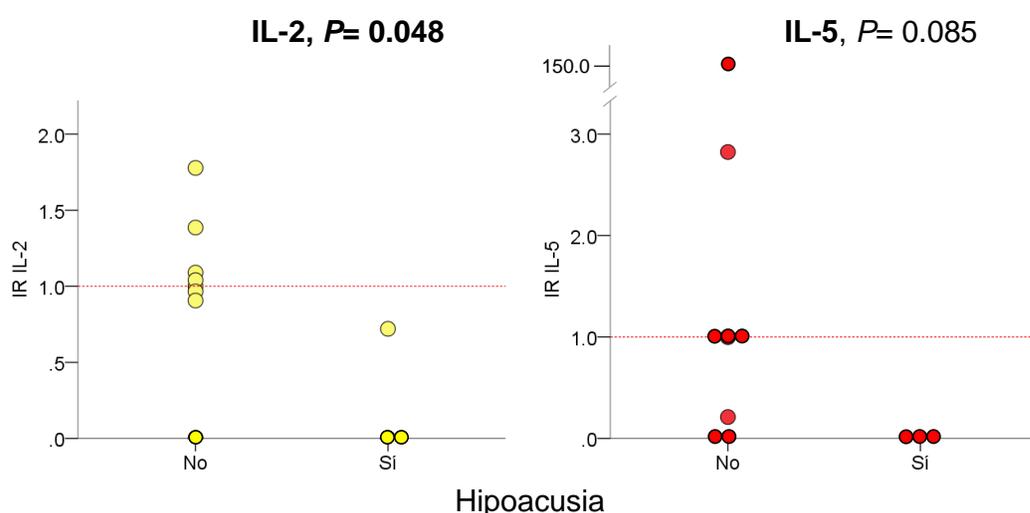


Figura 10. Relación entre el índice de reactividad (IR) de IL 2 y 5, con la presencia de hipoacusia en menores de un año con toxoplasmosis congénita y aquellos sin este problema clínico. La línea roja punteada representa el punto de corte; cada punto corresponde a un caso. La significancia estadística se determinó por la prueba de U de Mann Whitney.

En el Cuadro 7 se muestran asociaciones entre varios problemas neurológicos y otras manifestaciones clínicas. Cabe resaltar que el retraso del neurodesarrollo se asoció de manera “*protectora*” con manifestaciones neurológicas, tales como convulsiones, dolicocefalia, megacisterna magna, potenciales visuales alterados, atrofia cerebral, implantación auricular baja, hiperproteínorraquia, macrocefalia, asimetría ventricular cerebral, y hemorragia intracraneal.

Cuadro 7. Asociación entre tipos de manifestaciones neurológicas con otras variables clínicas en niños menores de un año con toxoplasmosis congénita.

Variable	n	Hidrocefalia	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P	
Ictericia	sí	11	6	54.5%	19.2	1.8-200.0	0.007
	no	17	1	5.9%			
Otras manifestaciones sistémicas	sí	12	6	50.0%	15.0	1.5-152.5	0.008
	no	16	1	6.3%			
Variable	n	Microcefalia	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P	
Hepatomegalia	sí	11	3	27.3%	1.4	1.0-2.0	0.050
	no	17	0	0.0%			
Variable	n	Retraso del neurodesarrollo	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P	
Otras manifestaciones neurológicas	sí	14	14	100.0%	0.6	0.4-1.0	0.020
	no	14	9	64.3%			
Variable	n	Otras manifestaciones neurológicas	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P	
Otros hallazgos	sí	14	8	57.1%	1.8	0.4-7.9	0.027
	no	14	6	42.9%			
Esplenomegalia	sí	7	6	85.7%	9.8	1.0-96.7	0.038
	no	21	8	38.1%			
Otras manifestaciones sistémicas	sí	12	9	75.0%	6.6	1.2-35.4	0.060
	no	16	5	31.3%			
Hepatomegalia	sí	11	8	72.7%	4.9	0.9-25.7	0.060
	no	17	6	35.3%			

La significancia estadística se determinó por medio de la Fisher exacta.

Cuando se compararon otras variables clínicas con el grado de retraso en el neurodesarrollo, se encontró que a mayor gravedad de éste, se incrementa la frecuencia de diversos problemas, tanto oculares como de otros órganos y tejidos (cuadro 8).

Así mismo, se encontró un incremento de la producción de anticuerpos IgG2, IgG3 e IgA conforme el grado de retraso en el neurodesarrollo era mayor, aunque esta asociación no fue significativa para IgG2 (Figura 11).

Cuadro 8. Asociación entre el grado de retraso en el neurodesarrollo y variables clínicas de niños menores de un año con toxoplasmosis congénita.

Variable	Frecuencia de casos con retraso del neurodesarrollo				P
	Ninguno n=5	Leve n=11	Moderado n=4	Grave n=8	
Otras manifestaciones oculares diferentes a coriorretinitis	0 (0.0%)	1 (9.1%)	1 (25.0%)	6 (75.0%)	0.006
Hipoacusia	1 (20.0%)	1 (9.1%)	1 (25.0%)	6 (75.0%)	0.020
Otras manifestaciones neurológicas	0 (0.0%)	5 (45.4%)	2 (50.0%)	7 (87.5%)	0.022
Esplenomegalia	1 (20.0%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	5 (62.5%)	0.031
Manifestaciones oculares totales	0 (0.0%)	3 (27.3%)	2 (50.0%)	6 (75.0%)	0.039
Comorbilidades	0 (0.0%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	4 (50.0%)	0.043

La significancia estadística se determinó por medio de la Fisher exacta.

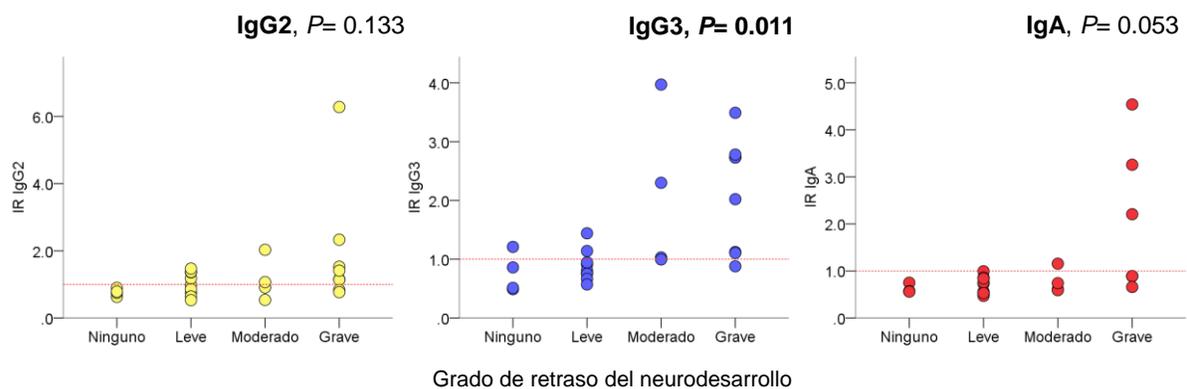


Figura 11. Relación entre el índice de reactividad (IR) de las subclases 2 y 3 de IgG e IgA, con el grado de retraso en el neurodesarrollo en menores de un año con toxoplasmosis congénita. La línea roja punteada representa el punto de corte; cada punto corresponde a un caso. La significancia estadística se determinó por la prueba de U de Mann Whitney.

Aunque no hubo significancia estadística, se encontraron frecuencias mucho más altas de varios problemas como hidrocefalia, otras manifestaciones neurológicas e ictericia en los casos con infección diseminada que en aquellos con localización neurológica o neurooftálmica. Asimismo los casos diseminados o con afección neurooftálmica también nacieron de embarazos de alto riesgo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Asociación entre la localización de las manifestaciones y otras variables clínicas de niños menores de un año con toxoplasmosis congénita.

Variable	Frecuencia de casos con localización			P
	Diseminada n=14	Neurooftálmica n=5	Neurológica n=9	
Hidrocefalia	6 (42.9%)	0 (0.0%)	1 (11.1%)	0.083
Otras manifestaciones neurológicas	10 (71.4%)	2 (40%)	2 (22.2%)	0.062
Ictericia	8 (57.1%)	0 (0.0%)	3 (33.3%)	0.073
Embarazo de riesgo	11 (78.6%)	4 (80.0%)	3 (33.3%)	0.063

La significancia estadística se determinó por medio de la Fisher exacta.

Se encontró que los varones tuvieron mayor riesgo de desarrollar macrosomía, desnutrición, hidropesía fetal, craneosinostosis, hipoplasia cerebelosa, higroma subdural, cabeza en gota, microretrognatia, dacriostenosis, persistencia conducto arterioso, foramen oval permeable, comunicación interventricular e interauricular, reflujo gastroesofágico, estenosis hipertrófica de píloro, hernia umbilical, acortamiento de extremidades, diabetes insípida; además, presentaron criptorquidia e hidrocele. Todas estas manifestaciones se asociaron con la gravedad del cuadro clínico y estuvieron más presentes en el subgrupo de otras manifestaciones sistémicas (cuadro 10).

Cuadro 10. Asociación entre hallazgos con variables indicativas de gravedad entre sí y con el sexo de los niños menores de un año con toxoplasmosis congénita.

Variable		n	Gravedad	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P
Otras manifestaciones sistémicas	moderada /grave	18	11	61.1%	14.1	1.5-137.3	0.011
	leve	10	1	10.0%			
Variable		n	Otros hallazgos	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P
Sexo	masculino	17	12	70.6%	10.8	1.7 -68.9	0.009
	femenino	11	2	18.2%			
Otras manifestaciones sistémicas	sí	12	5	41.7%	10.7	1.0-109.8	0.036
	no	16	1	5.3%			
Gravedad	moderada /grave	18	6	33.3%	1.5	1.1-2.1	0.049
	leve	10	0	0.0%			

La significancia estadística se determinó por medio de la Fisher exacta.

Se encontró a la IgA como factor protector del desarrollo de otras manifestaciones sistémicas (cuadro 11). El TNF- α y la proliferación de linfocitos T CD8+ son factores de riesgo para presentar lesiones graves, y la IgG4 para la presencia de comorbilidades, mientras que el INF- γ fue asociado como factor protector contra este último aspecto clínico.

Al comparar la respuesta inmune celular con la humoral, encontramos que la mayoría de linfocitos T (CD3+) que proliferaron fueron del tipo CD4+ a diferencia de los CD8+ A mayor producción de IL-2 había una menor proliferación de los linfocitos citotóxicos CD8+ (Figura 12).

Cuadro 11. Asociación entre el cuadro clínico y la respuesta inmune.

Variable	n	Gravedad	Frecuencia	RM	IC _{95%}	P	
TNF-a	pos	8	6	75.0%	4.0	1.2-13.3	0.061
	neg	3	0	0.0%			
CD8+	pos	7	5	71.4%	3.5	1.1-11.3	0.083
	neg	3	0	0.0%			
IL-2	pos	5	1	20.0%	0.05	0.02-1.1	0.067
	neg	6	5	83.3%			
Variable	n	Comorbilidades	%	RM	IC _{95%}	P	
IgG4	pos	7	4	57.1%	22.7	1.8-279.4	0.012
	neg	18	1	5.6%			
INF-g	pos	4	0	0.0%	0.33	0.1-1.7	0.055
	neg	7	2	28.6%			

La significancia estadística se determinó por medio de la Fisher exacta.

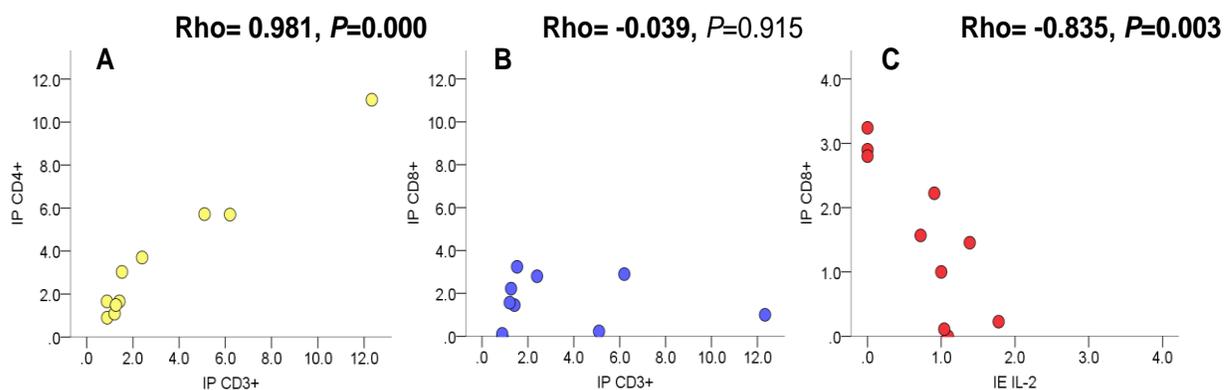


Figura 12. Relación entre proliferación de linfocitos CD3+, CD4+, CD8+ y la producción de IL-2. La línea roja punteada representa el punto de corte; cada punto corresponde a un caso. La significancia estadística se determinó por la prueba de U de Mann Whitney.

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue describir la relación que hay entre las manifestaciones clínicas y el perfil de la respuesta inmune, tanto humoral como celular, que se desarrolla en los menores de un año con toxoplasmosis congénita.

Primero analizamos la relación de los aspectos clínicos entre sí y luego, de éstos con la respuesta inmune. Observamos que los niños con toxoplasmosis congénita, cuyas madres que recibieron tratamiento prenatal específico, presentaron las manifestaciones clínicas más leves. En contraste, los niños que fueron referidos postnatalmente por sospecha clínica desde otra unidad de salud (enfermedad clínicamente evidente) mostraron las manifestaciones más graves. De aquí deriva la importancia de realizar un programa de tamizaje prenatal para brindar tratamiento oportuno a las gestantes y prevenir la transmisión vertical o limitar el daño al feto. Cabe resaltar que ninguno de los 28 casos fue asintomático y además tuvieron mayor diversidad de manifestaciones clínicas que las descritas clásicamente en la literatura de América del Norte y Europa (13). Más aun, encontramos el caso de un bebé que nació con anoftalmia y hendidura craneofacial tipo III, que fue publicado recientemente (31).

La mayoría de los niños con antecedentes prenatales adversos presentaron peso bajo para la edad gestacional. Esto puede derivarse de una gran carga parasitaria en la placenta. La infección de este órgano se ha asociado a inflamación y trombosis locales y graves, disminuyendo la transmisión vertical, pero también el aporte sanguíneo al feto, como fue observado en ratones por Vargas-Villavicencio y col. (32).

En cuanto a las manifestaciones físicas de la enfermedad, de acuerdo con la Academia Americana de Pediatría, en Estados Unidos y Francia las alteraciones más comunes reportadas ocurren a nivel ocular, seguidas de las calcificaciones cerebrales, siendo ambas mucho más frecuentes en el primer país. Sin embargo en Brasil la proporción alteraciones es similar para ambas (13). En contraste, en esta tesis la manifestación más frecuente fue el retraso en el neurodesarrollo y en

segundo lugar las alteraciones neurológicas. La variabilidad de manifestaciones clínicas mostrada en nuestro estudio y en estos países puede deberse a la diversidad genética del parásito y al tipo de respuesta inmune que desarrollan los neonatos de las diferentes razas.

Cuadro 12. Frecuencias de problemas clínicos en el INP y otras regiones

INP	Estados Unidos	Francia	Brasil
Retraso del neurodesarrollo 82.1%	Retinocoroiditis 92.0%	Alteraciones oculares 14.0%	Calcificaciones cerebrales 53.0%
Alteraciones neurológicas 50.0%	Calcificaciones cerebrales 80.0%	Retinocoroiditis 10.0%	Retinocoroiditis 50.0%
Ictericia 39.3%, hepatomegalia 39.3%, alteraciones oculares 39.3%	Hidrocefalia 68.0%	Calcificaciones cerebrales 9.0%	Hipoacusia 40.0%

Cuando el cuadro clínico fue diseminado, se presentó un mayor porcentaje de alteraciones asociadas a gravedad; por ejemplo, otras manifestaciones neurológicas, ictericia e hidrocefalia. Es importante hacer notar que ninguno o pocos casos positivos para estas manifestaciones ocurrieron cuando la clínica fue más localizada, es decir, neurológica o neurooftálmica.

Diversas manifestaciones clínicas graves, tanto sistémicas como locales, se asociaron de manera significativa con el desarrollo de hipoacusia. Por lo tanto, esta alteración podría usarse como marcador de gravedad; proponemos realizar estudios para valorar el uso de tamiz auditivo como prueba pronóstica en neonatos con toxoplasmosis congénita.

Como se mencionó anteriormente, la mayor diversidad y gravedad de problemas clínicos podría deberse a la variabilidad del parásito en México, a la presencia de cepas más virulentas o de infecciones mixtas (con más de una cepa del parásito),

como se reportó en 2018 (22). Hay evidencia de que la respuesta inmune juega un papel importante en el control de la infección; pero, paradójicamente también en el desarrollo de manifestaciones clínicas (23,24,26). En particular, se reportó hace algunos años que los anticuerpos de las subclases IgG3 e IgG4 producidos por el bebé, se asocian a un cuadro clínico evidente desde el nacimiento (29,33). Sin embargo, no se estudiaron la respuesta celular, ni los aspectos clínicos específicos, por lo que hicimos el presente estudio, en donde encontramos que las subclases 1, 2 y 3 de IgG predisponen a daño ocular en general, que incluye alteraciones visuales (retinocoroiditis y otras) y que los anticuerpos IgG2, IgG3 e IgA se asociaron con mayor grado del retraso del neurodesarrollo. En el estudio previo, la IgG1 materna se asoció con problemas clínicos, lo que es congruente con los hallazgos actuales con respecto a la retinocoroiditis (29); pero en este trabajo se encontró que la IgG4 fue “protectora” contra la retinocoroiditis. Dos diferencias entre este estudio y el previo son que en éste describimos las manifestaciones clínicas en los bebés y no distinguimos los anticuerpos de la madre de los del niño; ambas cosas podrían explicar las diferencias encontradas. La IgG1 y la IgG3 fijan el complemento y son opsoninas para macrófagos y neutrófilos; además, se asocian a una respuesta TH₁, que si bien controla la replicación del parásito, puede inducir inflamación y por ende daño.

En cuanto a la respuesta inmune celular, la inducción de una respuesta de tipo TH₁, caracterizada por la estimulación de células CD4+, con producción de IL-2, IL-12, IFN- γ es necesaria para la protección contra *T. gondii*. Se sabe que las citocinas e interleucinas antiinflamatorias y las ligadas a una respuesta TH₂ modulan una respuesta TH₁. La IL-2 es necesaria para la supervivencia y la función de los linfocitos T efectoras, de memoria y reguladores (controlando las respuestas inmunitarias); además, estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos NK y B (34). Los resultados de esta tesis sugieren que el IFN- γ , la IL-2 y la IL-5 juegan un papel protector frente al desarrollo de manifestaciones oculares en general y las dos últimas frente a la hipoacusia también. Cabe resaltar que en tres de los cinco casos que no presentaron estas alteraciones oculares, se observó un índice de reactividad positivo en IL-2, IL-4, IL-5 e INF- γ .

Globalmente, los resultados sugieren que diversos componentes de la respuesta inmune juegan roles particulares en el desarrollo de problemas clínicos específicos, pero en general, apoyan la hipótesis de que una respuesta TH₁ robusta y balanceada, a través de la producción de citocinas TH₂ (y no a la que se esperaba, por TGF-β o IL-10), se asocia con un cuadro clínico menos grave, y que los linfocitos citotóxicos están teniendo un papel deletéreo sobre la problemática clínica de los niños con toxoplasmosis congénita.

CONCLUSIONES

- Las manifestaciones clínicas encontradas son más diversas y graves que las reportadas clásicamente en la literatura de América del Norte y Europa.
- La mayoría de niños con infección congénita por *T. gondii* presentaron retraso global del neurodesarrollo.
- Los datos sugieren que la hipoacusia podría usarse como marcador de gravedad, por lo que el tamizaje auditivo promete ser útil para el pronóstico en la toxoplasmosis congénita.
- Los anticuerpos IgG1, IgG2 e IgG3, así como los linfocitos CD8+ y el TNF-α, se asociaron a problemas clínicos en general.
- En contraste, los anticuerpos IgG4, el IFN-γ, la IL-2 y la IL-5 parecen favorecer un mejor cuadro clínico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 2004; 126:57–72.
2. Kennou MF. *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909). *Arch Inst Pasteur Tunis.* 1986; 63:123–31.
3. Giraldo-Restrepo ML. Toxoplasmosis. *Med Lab.* 2008;14:359–75.
4. Caballero-Ortega H, Ortíz-Alegría LB R-TC. Toxoplasmosis. En: Correa D, Figueroa-Damián R (Editores). *Infecciones congénitas y perinatales: Una visión integral.* 1a edición. México: Editorial Médica Panamericana; 2014. p. 167–73
5. McLeod R, Van Tabbergen CMBK. Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*). En: Kliegman R, editor. *Nelson Tratado de Pediatría.* 20th ed. China: Elsevier; 2016. pp.1806–17.
6. Torrey EF, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:1375–80.
7. Fekadu A, Shibre T, Cleare AJ. Toxoplasmosis as a cause for behavior disorders-overview of evidence and mechanisms. *Folia Parasitol (Praha).* 2010; 57:105–13.
8. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis.* 1992; 15: 211–22.
9. Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25:264–96.
10. Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 2008; 47: 554–66.
11. 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; 353:1829–1833
12. Frenkel JK 2000. Biology of *Toxoplasma gondii*. En: Ambroise-Thomas P, Petersen E. *Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control,* Springer, Paris, pp. 9-25.

13. Maldonado YA, Read JS, AAP Committee on Infectious Diseases. Diagnosis, treatment, and prevention of congenital toxoplasmosis in the United States. *Pediatrics*. 2017; 139: e20163860.
14. Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Cedillo-Pelaez C, Vargas-Villavicencio JA, Luna-Pastén H, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Correa D. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans Roy Soc trop Med Hyg* 2012; 106: 653-659.
15. Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortés J, Ortega-Velázquez V, Galván-Ramírez ML, Ruiz-García M, Saltigeral-Simentel 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.
16. Martín-Hernández I, García-izquierdo DSM. Toxoplasmosis en el hombre. *Bioquímica*. 2003; 28:19-27.
17. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995; 172:1561–6.
18. Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol*. 2003; 11:426–30.
19. 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* 2016; 35: 1078-88.
20. Rico-Torres CP, Figueroa-Damián R, López-Candiani C, Macías-Avilés HA, Cedillo-Peláez C, Cañedo-Solares I, Luna-Pastén H, Tecuatl-Herrada BL, Correa D. Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31:411–3.
21. Rico-Torres CP, Del Viento-Camacho A, Caballero-Ortega H, Besné-Mérida A, Luna-Pastén H, Correa D, Palma-García JM. First isolation of *Toxoplasma gondii* from cats of Colima, Mexico: tissue distribution and genetic characterization. *Vet. Parasitol* 2015; 209: 125-8.

22. Rico-Torres CP, Valenzuela-Moreno LF, Luna-Pastén H, Figueroa-Damián R, Gomez-Toscano V, Hernández-Delgado L, Escobedo-Torres MP, Correa D. High heterogeneity, mixed infections and new genotypes in human congenital toxoplasmosis cases in the mega-metropolis of Central Mexico. *Acta Trop.* 2018; 178:124-9.
23. 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.
24. 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; 651-60.
25. Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol.* 2012; 34: 793-813.
26. 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 (ed.). *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases.* Research Signpost. Kerala, India. 2007. pp. 199-224.
27. Pfaff A, Abou-Bacar A, Letscher- Bru V, Villard O, Senegas A, Mousli M, Candolfi E. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN- γ . *Parasitology* 2007; 134: 1895-1902.
28. Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Figueroa-Damián R, Bustos-Bahena ML, González-Henkel H, Calderón-Segura E, Luna-Pastén H, Correa D. Toxoplasmosis in pregnancy: determination of IgM, IgG and avidity in filter paper-embedded blood. *J Perinatol* 2009; 29:668-72.
29. Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez ML, Luna-Pastén H, Rodríguez Pérez R, Ortiz-Alegría LB, Rico-Torres CP, Vela-Amieva M, Pérez-Andrade M,

- Figueroa-Damián R, Correa D. Human congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27:469-74.
30. Cañedo-Solares I, Gómez-Chávez F, Luna-Pasten H, Ortiz-Alegría LB, Flores García Y, Figueroa-Damián R, Correa D. What do anti-*Toxoplasma gondii* IgA and IgG subclasses in human saliva indicate?. *Parasite Immunol* 2018; 40: e12526.
31. Arce-Estrada GE, Gómez-Toscano V, Cedillo-Peláez C, Sesman-Bernal AL, Bosch-Canto V, Mayorga-Butrón JL, Vargas-Villavicencio JA, Correa D. Anophthalmia and craniofacial cleft in a newborn with *Toxoplasma gondii* congenital infection. Report of an unusual case. *BMC Infect Dis* 2017; 17: 459-63.
32. Vargas-Villavicencio, J.A., Besné-Mérida, A., Correa, D. Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: A systematic review. *Vet Parasitol* 2016; 223:195-204.
33. de Souza-e-Silva CH, Vasconcelos-Santos DV, de Andrade GQ, Carellos EV, de Castro Romanelli RM, de Resende LM. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013; 32:13-6.
34. Abbas Abul K, Lichtman Andrew H, Shiv Pillai. *Inmunología celular y molecular*. Barcelona, España, 2015. pp. 265-280