

Frecuencia de citomegalovirus humano asociado a abortos

(Frequency of cytomegalovirus associated to abortions)

Pascual Francisco Lucio Monter,* Ramón Arturo Valdés Espinosa,* Sergio Gabriel Martínez Salas,** Jaime López Cruz,*** Hilda Beatriz Gómez Robledo,* Luz María Aguilar Anguiano****

RESUMEN

Objetivo. Conocer la frecuencia de citomegalovirus (CMVH) identificados en mujeres que abortaron.

Material y métodos. Se examinaron 182 muestras de sangre materna y de tejido trofoblástico de mujeres que abortaron. Se extrajo el DNA de las muestras obtenidas y fue sometido a un estudio de PCR para identificar el virus.

Resultados. Los resultados fueron positivos en 39 muestras de sangre materna (21.4%) y en 34 de los estudios hechos en el trofoblasto (18.7%).

Conclusiones. Los resultados confirman que la infección activa por CMVH se asocia alrededor de dos de cada diez abortos que ocurren en el primer trimestre de la gestación.

Palabras clave: Citomegalovirus, aborto, infección intrauterina, secuenciación.

SUMMARY

Aim. To identify the frequency of CMVH in women with spontaneous abortion.

Material and methods. 182 samples of DNA in the whole blood and placenta tissues of women that had spontaneous abortion were studied in the first trimester of gestation. PCR assays were done in order to determine presence of CMVH in the samples.

Results. 39 (21.4%) of the blood samples and 34 (18.7%) of placenta studies of PCR were positive for the virus.

Conclusions. Results are in accord with the CMVH infection is one of the main causes of spontaneous abortion in first trimester of the gestation.

Key words: Cytomegalovirus, abortion, intrauterine infection, PCR.

El citomegalovirus humano (CMVH) es un β herpes virus responsable en la morbilidad y mortalidad de un número importante de niños recién nacidos (RN);¹⁻³ su frecuencia varía entre 0.2 y 2.2% de los RN con enfermedad grave no mortal, entre aquéllos con bajo peso al nacer, en tanto que 10 a 30% de los lactantes con infección manifiesta mueren en los primeros meses de vida.⁴⁻⁶

Entre las causas de aborto se incluyen las infecciones por agentes virales;⁷ en estos casos, la infección primaria en la madre es transmitida al feto durante las primeras 16 semanas de embarazo.⁸ En las infecciones congénitas el virus invade las vellosidades coriales de la placenta, la que luego funciona como un depósito viral⁶ y ambas infecciones se acompañan de inflamación placentaria y restricción del crecimiento fetal intrauterino, lo que da lugar a aborto, óbito o recién nacidos con síntomas de la infección viral.⁹

La expresión génica del CMVH ocurre en tres fases: temprana (E), inmediato temprana (IE) y tardía (L). La replicación del ADN viral es requisito previo para que ocurra la última transcripción viral del gen por proteínas estructurales de la etapa tardía (gB), lo que tiene particular importancia como antígeno en la respuesta inmune,

* Biólogo. Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea SEDENA.

** Médico, Maestro en Ciencias. Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea SEDENA.

*** Médico Anatomopatólogo. Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea SEDENA.

**** Bióloga. Clínica de Especialidades de la Mujer, SEDENA.

tanto celular y humoral.^{10,11} En esta comunicación se investigó la relación que pudiera haber entre los CMVH y el aborto, se estimó la frecuencia de infección por este virus, en sangre periférica y en la placenta de mujeres que abortaron.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre 323 mujeres atendidas por aborto en una clínica especializada en enfermedades de la mujer de la SEDENA,⁵ en 182 se obtuvo una muestra de trofoblasto placentario y una de sangre para estudio; el resto fueron excluidas por las siguientes causas: 6 por diagnóstico de enfermedad trofoblástica, 4 por haber categorizado erróneamente la muestra como trofoblasto, 47 por no observar vellosidades coriales en el estudio histopatológico, 31 por tener sólo una de las dos muestras requeridas, 22 por no haber tenido acceso a los expedientes clínicos y en 31 por diversas circunstancias técnicas.

En las muestras de sangre se extrajo el ADN de acuerdo con la técnica de Sambrook et al 1994¹² constatando su integridad en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para luego ser cuantificado por espectrofotometría. Para su amplificación, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se siguió el procedimiento método de XXX. En el análisis de los productos de PCR se utilizó gel de agarosa con bromuro de etidio y se observó con luz UV en el transiluminador, capturando la imagen por fotografía con una cámara Polaroid modelo MP-4.

Se tomaron cinco muestras al azar de los distintos genes amplificados para confirmar que los fragmentos correspondían a CMVH y se secuenciaron utilizando el kit de secuencia Big Dye 3.1 en un secuenciador Avant 3100, Applied Biosystems; la secuencia se comparó con el Gene Bank para determinar el porcentaje de homología con respecto a CMVH.

RESULTADOS

Los resultados del PCR muestran la amplificación del ADN viral, correspondiente a la porción de los genes IE y GB de las muestras de sangre y trofoblasto (Figura 1).

De las 182 muestras de sangre materna, 39 fueron positivas (21.41%), 9 amplificaron para la proteína IE (4.9%) y 20 (10.98%) para la glicoproteína GB; 10 de las 39 muestras fueron positivas para ambos marcadores (5.49%). Con respecto a las 182 muestras de trofoblasto, 34 (18.7%) fueron positivas; de éstas 7 (3.84%) lo

fueron para IE y 19 (10.43%) para GB; 8 (4.39%) de las 34 amplificaron para ambos marcadores (Cuadro 1).

El resultado de las muestras positivas con el marcador para la proteína IE fue de 19 (10.4%) en la sangre y de 15 (8.2%) en el trofoblasto; con el marcador para la proteína GB fueron 30 (16.5%) en la sangre y 27 (14.8%) en trofoblasto. Cuatro de los binomios sangre-trofoblasto dieron resultados positivos con los dos pares de marcadores y en ambos tipos de muestra (Cuadro 2). En cuanto a las muestras secuenciadas, hubo 100% de homología respecto a la proteína IE1 y ésta fue de 99% para la proteína GB, correspondientes, ambas, al citomegalovirus humano.

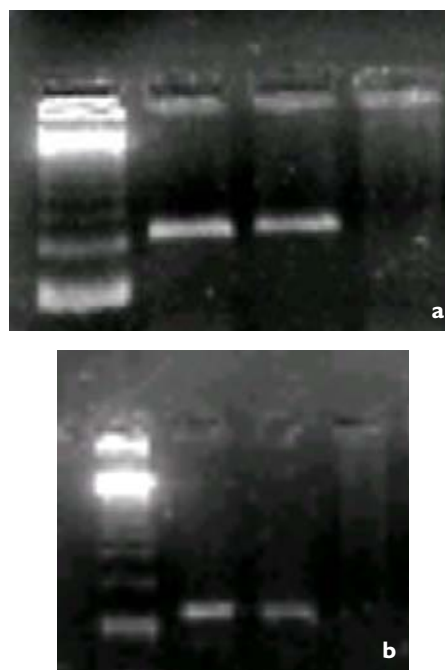


Figura 1. a) Amplificación de ADN viral de la proteína IE de 275 pb: carril 1 marcador de tamaño molecular de 123 pb, carril 2 control positivo, carril 3 muestra positiva y carril 4 control negativo. b) ADN vital de la proteína GB de 175 pb, carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 control positivo, carril 3 muestra positiva, carril 4 control negativo.

Cuadro 1. Frecuencia de las muestras de sangre y trofoblasto positivas a citomegalovirus en 182 mujeres atendidas por aborto.

Muestras	IE+ (%)	GB + (%)	IE y GB + (%)	Total n (%)
Sangre 182	9 (4.9)	20 (10.9)	10 (5.49)	39 (21.4)
Trofoblasto 182	7 (3.8)	19 (10.4)	8 (4.4)	34 (18.7)

⁵ Secretaría de la Defensa Nacional de México.

Cuadro 2. Resultados de cada marcador (***) expresado como porcentaje de cuatro binomios positivos.

Muestras	IE + (%)	GB + (%)	*** (%)
Sangre	19 (10.4)	30 (16.5)	2.2
Trofoblasto	15 (8.2)	27 (14.8)	2.2

DISCUSIÓN

La importancia de obtener un diagnóstico de las infecciones virales con la mayor sensibilidad y especificidad posible, tiene como ventaja que repercute en el manejo clínico que se debe hacer en el enfermo y tratándose de la infección prenatal por CMVH tiene aún un mayor potencial de trascendencia en el desarrollo de los recién nacidos.¹³ Los resultados de esta investigación son similares a los de otros estudios divulgados por otros investigadores, los que informan una frecuencia de 20 y 50% de las mujeres embarazadas con NMVH.^{8,14,15}

Así pues, el porcentaje de 21.4% en las muestras de sangre está dentro del margen de infección reportado y por lo menos en el 18.7% de los tejidos trofoblásticos sugirieron que había una infección activa en el primer trimestre de la gestación; esto parece concordar con estudios epidemiológicos que señalan la presencia de infección en los dos primeros trimestres del embarazo.¹⁶ Por otra parte, el hecho de que 2.2% de los casos fueron positivos en las muestras de sangre y de trofoblasto, para los dos marcadores (IE y GB), parece coincidir con lo reportado por Spano et al,¹⁷ quienes encontraron que 75% de los casos tienen un antígeno, por lo menos, relacionado con los abortos que ocurren durante el primer trimestre; además, hay evidencia de infección primaria por CMVH en 15% al principio del embarazo, en mujeres que abortaron espontáneamente, encontrando infección de la placenta y las vellosidades coriónicas.^{18,19}

En otro estudio,²⁰ utilizando distintos métodos de diagnóstico, los autores encontraron que en 33.3% de las mujeres embarazadas se hizo el diagnóstico por PCR mientras que por el método de ELISA con anticuerpos IgG e IgM obtuvieron los mismos resultados. Esto indica que las mujeres, al igual que los varones, pueden adquirir la infección en cualquier etapa de su vida, permaneciendo el virus latente en el huésped; sin embargo, con los cambios fisiológicos relacionados con el embarazo se reactiva el CMVH, dando lugar a una infección activa.

En esta investigación, los resultados obtenidos con PCR permiten afirmar que existió la infección por CMVH en la sangre y en el trofoblasto, en porcentajes similares (Cuadro 1) así como también el marcador GB en la sangre

materna estuvo de acuerdo con los resultados previamente reportados^{21,14} de que en 30.7% de las mujeres embarazadas ocurre la transmisión intrauterina del virus hacia el feto y en 69% hay infección en la placenta y el tejido decidual.²² Aunque las técnicas son similares la diferencia en los resultados puede ser debida a múltiples factores: de índole poblacional, socioeconómico, cultural, así como el tamaño de la muestra y los procedimientos de laboratorio empleados en la investigación.

A un lado de estas observaciones, los resultados de esta investigación parecen confirmar la frecuencia de la infección por CMVH, una de las principales causas de abortos espontáneos en el primer trimestre de gestación de mujeres mexicanas.

Referencias

- Villalba-Magdaleno J, Valdés-Espinosa R. Las citocinas en la patogénesis por citomegalovirus. *Rev Biomed* 2000; 11: 293-300.
- Bravo F, Cardin R, Bernstein D. Effect of maternal treatment with cyclic HPMPG in the Guinea pig model of congenital cytomegalovirus infection. *J Infec Dis* 2006; 7: 591-7.
- Reeves M, MacAry P, Lehner P, Sissons G, Sinclair J. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Nat Acad Sci* 2005; 102(11): 4140-5.
- Freig B, Sever J. Herpesvirus infections in pregnancy: Risk to embryo fetus, and neonate. *Clin Perinatol* 1988; 15: 203-31.
- Gaytan M, Steegers E, Semmekrot B, Merkus H, Galama J. Congenital cytomegalovirus infection. Review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv* 2002; 57: 245-56.
- Martínez-Díaz G, Valdés-Abreu M, Resik AS. Infecciones por citomegalovirus. *Rev Cub Med Gen Integr* 1998; 14(3): 270-8.
- Spano-Cruz L, Pereyra-Lima E, Gomes-da Silva N, Mercon de Vargas R. Human cytomegalovirus infection and abortion: an immunohistochemical study. *Med Sci Monit* 2002; 8(6): 230-5.
- Gouarin S, Gault E, Vabret A, Cointe D, Rosenberg F, Grangeot L, Barjot P, Garbag A, Lebon P, Freymuth F. Real-Time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microb* 2002; 1767-72.
- Hemmings D, Guilbert L. Polarized release of human cytomegalovirus from placental trophoblasts. *J Virol* 2002; 6710-1.
- Chan G, Hemmings D, Yurocbko A, Guilbert L. Human cytomegalovirus-caused damage to placental trophoblasts mediated by immediate-early gene-induced tumor necrosis factor- α . *Am J Patol* 2002; 161(4): 1371-81.
- Ho M. *Cytomegalovirus: Biology and infection*. 2nd edition NY: Plenum Medical Book; 1991: 45.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1994.
- Aydan B, Gulendam B, Banu C, Bora D, Aysegul Y, Seyyal R et al. CMV by RT-PCR in prenatal diagnosis the detection of CMV in amniotic fluid and cervicovaginal smear samples by Real Time PCR assay in prenatal diagnosis. *Temmuz Cilt: Sayi: 2 Sayfa* 2005: 69-75.

14. Stagno S. Cytomegalovirus. In: Remington JS, Klein JO, eds. *Infections diseases of the fetus and newborn infant*. (5th ed) Philadelphia: Saunders, 2001: 389-424.
15. Natali A, Valcavi M, Medici E, Dieci S, Montali, Chezzi C. Cytomegalovirus infection in an Italian population prevalence, virus excretion and maternal transmission. *Microbiologica* 1997; 24: 123-33.
16. García R, García P, Iglesias G, Ortiz Q. Citomegalovirus y embarazo. *Ginec Obstet Clin* 2004; 5(3): 156-69.
17. Spano-Cruz L, Vargas M, Ribeiro S, Leite P, Nascimento J. Cytomegalovirus in human abortion in Espirito Santo. *Brazil J Clin Virol* 2002; 25: 173-8.
18. Grazia M, Zavattoni M, Furione M, Lilleri D, Gorini G, Gerna G. Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. *J Infec Dis* 2002; 186: 553-7.
19. Tamiolakis D, Vénseles I, Lambropoulou M, Kotini A, Barbagadaki S, Nilcolaidou S, Boglou P, Papadopoulos N. Human decidual cells activity in women with spontaneous abortions of probable CMV aetiology during the first trimester of gestation. An immunohistochemical study with CMV-associated antigen. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2004; 47(3): 195-9.
20. Li A, Liu Q, Xia L, Li Y. Preliminary studies on pathogenic factors of human cytomegalovirus infection. *Chin J Exp Clin Virol* 2003; 17(4): 369-71.
21. Zeng W, Wen L, Chen S, Ling X. Evaluation on clinical application of three testing methods for human cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003; 23(2): 192-4.
22. Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Fisher S. Human cytomegalovirus transmission from the uterus to the placenta correlates with the presence of pathogenic bacteria and maternal. *Immunity J Virol* 2003; 24(77): 13301-14.

Correspondencia:
Biolog. Pascual Francisco Lucio Monter
Escuela Militar de Graduados de Sanidad
Cda. de Palomas s/n
Col. Lomas de San Isidro
Deleg. Miguel Hidalgo
México, D.F.
Tel. 5540 0759 ext. 1
xolotl30@hotmail.com