



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE CARDIOLOGIA CMN SIGLO XXI**

**SUBSEDE UMAE HG "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA"  
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA**

**"FRECUENCIA DE LA TRANSMISIÓN VERTICAL  
DEL CITOMEGALOVIRUS (CMV) EN UNIDADES  
DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL"**

**T E S I S   D E   P O S G R A D O**

**Que Para Obtener El Título De  
Medico Especialista En:**

**PATOLOGÍA CLÍNICA**

**Presenta:**

**DRA. KARINA PEÑAFLOR JUAREZ**

**Asesora:**

**Dra. Ma. Guadalupe Carrillo Montes**



**México, D. F.**

**2008**



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.

---

Dr. Rubén Arguero Sánchez  
Director de la UMAE Hospital  
De Cardiología CMN SXXI, IMSS

---

Dr. Armando Mansilla Olivares  
Director de la División de Educación  
Médica e Investigación, UMAE  
Hospital de Cardiología CMN SXXI, IMSS

---

Dra. Rosa María García Escamilla  
Profesora Titular del Curso de  
Postgrado en Patología Clínica,  
UMAE Hospital de Cardiología  
SXXI, IMSS.

---

Dra. Ma. Guadalupe Carrillo Montes  
Asesora de Tesis e Investigador  
asociado del Banco Central de Sangre  
Centro Médico Nacional la Raza IMSS.  
Profesora Adjunta del Curso de  
Postgrado en Patología Clínica.

## IDENTIFICACION DE LOS INVESTIGADORES

### I. Banco Central de Sangre (BCS) Centro Médico Nacional “La Raza” (CMNR) IMSS

#### INVESTIGADOR PRINCIPAL

##### **DRA. MA GUADALUPE CARRILLO MONTES**

Patólogo Clínico.

Banco Central de Sangre

CMNR IMSS

Tel: 57245900 ext. 24245.

Correo electrónico [carrillomgmd@yahoo.com.mx](mailto:carrillomgmd@yahoo.com.mx)

#### INVESTIGADORES ASOCIADOS

##### **DRA. KARINA PEÑAFLORES JUÁREZ**

Medico residente de tercer año de la especialidad en Patología Clínica

Hospital General CMNR.

Tel. 57245900 ext. 24245

Correo electrónico [peaflorjarez@yahoo.com.mx](mailto:peaflorjarez@yahoo.com.mx)

##### **DRA. ARACELI MALAGÓN MARTÍNEZ**

Jefatura de Educación e Investigación en Salud

Banco Central de Sangre.

Centro Médico Nacional “La Raza”

Instituto Mexicano del Seguro Social

Tel: 57245900 ext. 24215 y 24228

Correo electrónico [aritamm@hotmail.com](mailto:aritamm@hotmail.com)

##### **DR. ÁNGEL GUERRA MÁRQUEZ**

Jefe de Departamento Clínico.

Banco Central de Sangre.

CMNR IMSS

Tel: 57245900 ext. 24245.

Correo electrónico: [angelraton@terra.com.mx](mailto:angelraton@terra.com.mx)

## **II. UNIDAD DE INVESTIGACION MÈDICA EN INMUNOLOGIA E INFECTOLOGIA DEL HOSPITAL DE INFECTOLOGIA CMNR.**

### **DR. CÉSAR R. GONZÁLEZ BONILLA.**

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología.  
Hospital de Infectología  
Centro Médico Nacional "La Raza".  
Instituto Mexicano del Seguro Social.  
Tel: 57245900 ext. 24321  
Correo electrónico [c\\_gonzalez\\_bonilla@yahoo.com.mx](mailto:c_gonzalez_bonilla@yahoo.com.mx)

### **DRA. GUADALUPE DE LOS ÁNGELES GARCÍA ELORRIAGA**

Unidad de Investigación Médica en Inmunología en Infectología  
Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández, Centro Médico Nacional La Raza  
Instituto mexicano del Seguro Social.  
Tel. 57245900 ext.24321

## **III. CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL ( CINVESTAV)**

### **DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE**

Jefe de Departamento Biomedicina Molecular  
CINVESTAV  
Instituto Politécnico Nacional  
Tel. 50613800 ext. 5009  
Correo electrónico [vortiz@cinvestav.mx](mailto:vortiz@cinvestav.mx)

## **IV. LUGAR DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO:**

### **Banco de Células progenitoras de sangre de cordón umbilical del Banco Central de Sangre CMNR IMSS.**

Los dos centros que se mencionan al final, donde trabajan algunos de los investigadores asociados solo aportaron la capacitación del alumno en la técnica a utilizar.

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Quisiera hoy que el pensamiento puesto en cada palabra, se torne en un torrente de agradecimientos, a todos aquellos que hicieron posible realizar uno de mis sueños.

Pero de forma muy especial a mis padres, por ser mi sostén, y fortaleza, por su ejemplo de perseverancia pero sobre todo por ser mis Padres.

A mis hermanos por su apoyo incondicional.

Y a todos aquellos seres especiales que se cruzaron en mi camino y que dieron un nuevo brillo a mi vida.

Gracias.

Karina Peñaflor Juárez  
Enero -2008

<b>1. Resumen</b> .....	7
<b>2. Abstract</b> .....	8
• <b>Título</b> .....	9
<b>3. Antecedentes</b> .....	10
<b>3.6 Generalidades de Citomegalovirus</b> .....	11
<b>3.6 Morfología y características moleculares</b> .....	12
<b>3.6 Replicación Viral</b> .....	13
<b>3.6 Antecedentes de riesgo de transmisión viral vía trasplante de células progenitoras hematopoyética</b> .....	14
<b>3.5 Factores de riesgo para la enfermedad por CMV en pacientes con Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPH)</b> .....	14
<b>3.6 Seroprevalencia en mujeres embarazadas</b> .....	15
<b>3.7 Infección Congénita por Citomegalovirus</b> .....	16
<b>3.8 Métodos para la búsqueda de citomegalovirus en sangre de cordón umbilical. Métodos de detección de CMV</b> .....	17
<b>4. Justificación</b> .....	18
<b>5. Pregunta de Investigación</b> .....	18
<b>6. Hipótesis</b> .....	19
<b>7. Objetivo</b> .....	19
7. 1. Objetivo General.....	19
7. 2. Objetivos Específicos.....	19
<b>8. Material y Métodos</b> .....	19
8. 1. Descripción del estudio.....	20
8. 2. Análisis Estadístico.....	21
<b>9. Resultados</b> .....	22

<b>10. Discusión</b> .....	25
<b>11. Conclusión</b> .....	26
<b>12. Bibliografía</b> .....	27
<b>13. Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado</b> .....	30
<b>14. Anexo 2. Hoja de Recolección de Datos</b> .....	37

En años recientes la sangre de cordón umbilical (SCU) ha surgido como una alternativa para la obtención de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) para el trasplante en pacientes que no cuentan con un donador familiar compatible. A partir del primer trasplante realizado en 1988, en el mundo se han realizado más de 6,000 trasplantes con CPH de cordón umbilical.

La infección por Citomegalovirus (CMV) tiene una gran importancia en la morbilidad-mortalidad de los pacientes trasplantados con Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH); a pesar del uso profiláctico y regímenes de tratamiento con antivirales, la infección por CMV continua teniendo un efecto negativo en la sobrevida del paciente.

### **Objetivo.**

Determinar la prevalencia de transmisión vertical del CMV a través de la detección de los genes de las proteínas IE-1 y MCP mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

### **Material y métodos.**

Estudio observacional, transversal, comparativo, prospectivo. Se analizaron muestras de sangre materna y de cordón umbilical para determinar la presencia de los genes de las proteínas tempranas del CMV por la técnica de PCR. Los resultados obtenidos se analizaron con estadística descriptiva y porcentajes. Para la estadística inferencial se utilizará  $X^2$ , con una  $p < 0.05$  para la significancia estadística, calculando OR para la infección.

**Conclusión:** En este estudio piloto la tasa de transmisión vertical de infección por CMV es de 10%, la cual es mayor a la reportada en países desarrollados que es de 0.2 a 2%, pero similar a la reportada en países en vías de desarrollo como el nuestro.

**Palabras clave:** Citomegalovirus, Sangre de Cordón Umbilical, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Transmisión Vertical.

In the recent years, the umbilical cord blood (UCB) has arisen as an alternative way for the obtaining hematopoietic stem cells (HSC) for the transplant in patients who do not possess a familiar compatible donor. From the first transplant realized in 1988, in the world more than 6,000 transplants have been realized by HSC of umbilical cord.

The Citomegalovirus (CMV) infection has a great importance in the morbidity - mortality of the patients who was transplanted with HSC; in spite of the prophylactic use and rate of treatment with antiviral, the infection as constant CMV having a negative effect in the survival of the patient.

### **Objective**

The aim of this study was to determine the prevalence of vertical transmission of the CMV across the detection of the genes of the proteins IE-1 and MCP by means of the Chain reaction of the Polymerase (RCP).

### **Material and Methods**

A cross-over, comparative and observational study. There were analyzed samples of mother blood and of umbilical cord to determine the presence of the genes of the early proteins of the CMV for RCP's technique. The obtained results were analyzed by descriptive statistics and percentages. For the statistics inferential, will be in use Chi square test with one  $p < 0.05$  for the statistical significance, calculating OR for the infection.

### **Conclusion**

In this study, the rate of vertical transmission of infection for CMV is 10 %, which is bigger than the brought reported one in developed countries that it is from 0.2 to 2 %, but similar to the brought reported developing countries as ours.

**Key words:** Citomegalovirus, Umbilical Cord Blood, Chain Reaction of the Polymerase, Vertical Transmission.

***FRECUENCIA DE LA TRANSMISIÓN  
VERTICAL DEL CITOMEGALOVIRUS  
(CMV) EN UNIDADES DE SANGRE  
DE CORDON UMBILICAL***

## 1. ANTECEDENTES CIENTIFICOS

---

### Generalidades del citomegalovirus.

La familia *herpesviridae* comprende ocho miembros (que a su vez se dividen en tres sub familias (alfa, beta, gamma), Citomegalovirus (CMV) pertenece a la subfamilia  $\beta$ . Estos virus se caracterizan por permanecer en forma latente en las células del compartimiento hematopoyético del individuo infectado, teniendo tropismo por el linaje mieloide.<sup>1</sup>

Con el uso de la terapia inmunosupresora en los pacientes sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) y tras la pandemia del SIDA se observó que los individuos con compromiso inmunitario son susceptibles de desarrollar diferentes entidades nosológicas ocasionadas por la infección por CMV, entre las más importantes: supresión de medula ósea, retinitis, encefalitis, neumonitis, nefritis y hepatitis, entidades potencialmente fatales.<sup>2</sup>

Durante la infección primaria las células blanco del CMV son las células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, monocitos y células especializadas del parénquima como las neuronas, retina, músculo liso y hepatocitos. En los individuos inmunocompetentes la infección generalmente cursa asintomática o puede presentarse como un síndrome febril; la infección primaria generalmente ocurre durante la infancia, por lo que entre 60-100% de los individuos tienen serología positiva para CMV en la vida adulta, dependiendo del área geográfica y nivel social al que pertenezca.<sup>3</sup>

El virus permanece silente en el núcleo de las células (ciclo lisogénico) lo que le confiere la propiedad de poder transmitirse por vía sanguínea y reactivarse en los periodos de inmunosupresión<sup>4</sup>.

Las manifestaciones clínicas en un individuo susceptible son originadas por una reactivación del virus o por transmisión de novo. La reactivación es consecuencia del daño a la inmunidad celular, como ocurre en pacientes sometidos a inmunosupresión así como en pacientes con SIDA<sup>5</sup>.

### Morfología y características moleculares

El DNA viral es de doble cadena con una longitud de 245,000 pares de bases; está protegido por una nucleocápside icosaédrica compuesta de 162 capsómeros hexagonales, las cuales son rodeadas por una cubierta amorfa y una envoltura lipoprotéica. La cubierta esta compuesta en su mayoría por fosfoproteínas, las cuales son inmunogénicas. El virión consiste de tres regiones estructurales: la cápside, envoltura lipoproteica y tegumento.

El mecanismo por el cual las células son infectadas por el citomegalovirus es poco conocido, una de las propuestas es la interacción de las glicoproteínas virales que se encuentran sobre la superficie de las células infectadas y los receptores celulares contiguos, lo que media la transmisión de célula a célula<sup>6</sup>.

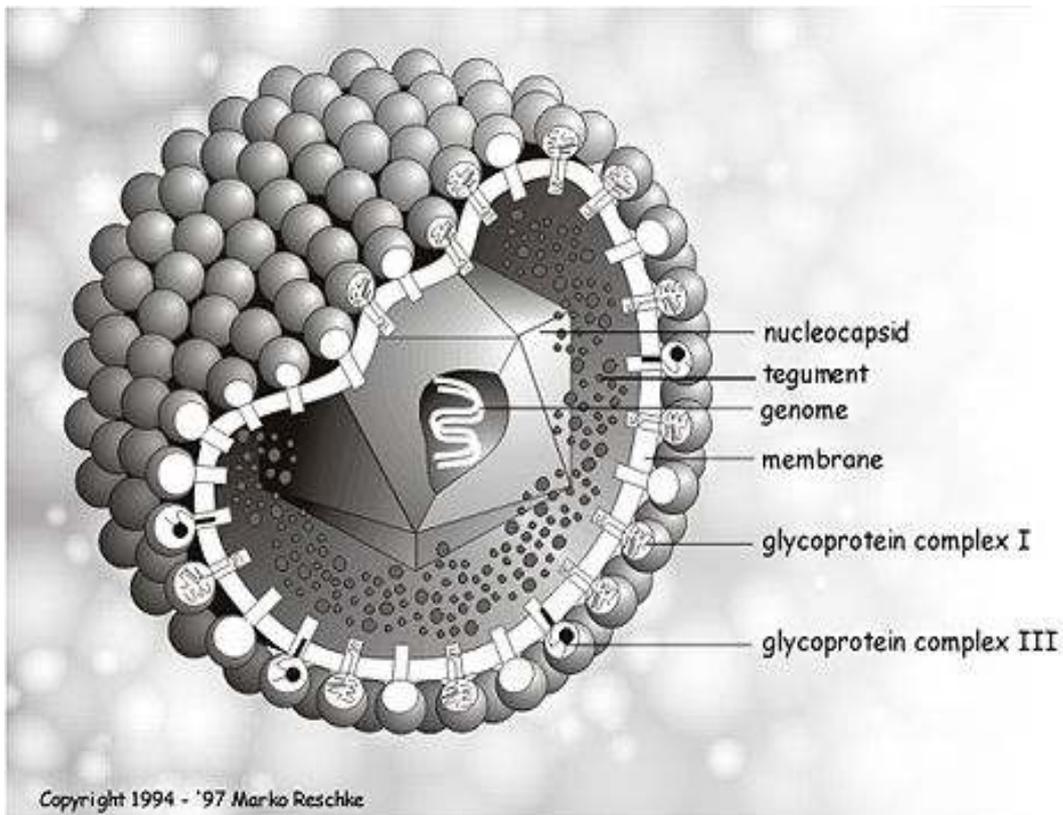


Figura. 1. Representación gráfica del CMV

## **Replicación del CMV**

La diseminación viral ocurre de célula a célula, durante la infección las glicoproteínas del CMV se distribuyen sobre la superficie celular. Las partículas virales a nivel extracelular son casi indetectables en plasma.<sup>7</sup>

### **Las fases específicas de la replicación viral son:**

- Fase I

El virus liga a la célula y la penetra.

- Fase II

La síntesis de proteínas virales en sucesión estricta

- Fase III

Repetición del DNA

Ensamblaje del virus

- Fase IV

El virus deja el retículo endoplasmico.

La replicación en la fase aguda de la enfermedad depende de la expresión de dos fosfoproteínas virales nucleares IE1 e IE2 o llamadas también proteínas inmediatas tempranas, responsables de la activación viral<sup>8</sup>.

### **Antecedentes de riesgo de transmisión viral vía trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.**

La transmisión de la infección por CMV es una de las complicaciones del trasplante de CPH; el periodo de mayor riesgo clínico se encuentra entre uno y cuatro meses posteriores al trasplante. La prevalencia del DNA de CMV en las Células Hematopoyéticas de Medula Ósea (MO) y de Cordón umbilical (SCU) es de 73% y 23% respectivamente, por lo que el riesgo de transmisión del Virus es menor con CPH provenientes de sangre de cordón umbilical<sup>9</sup>

### **Factores de riesgo para la enfermedad por CMV en pacientes con Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPH)**

Los factores de riesgo en pacientes con TCPH incluyen infección primaria ó la presencia de viremia y carga viral alta después de trasplante, pero el factor de riesgo más importante para desarrollar enfermedad por CMV es el grado de inmunosupresión y el estado serológico del receptor previo al trasplante. Se han realizado estudios observando que existe una reactivación del propio virus del receptor hasta en 41% en pacientes adultos trasplantados con SCU; cuando el donador es seropositivo y el receptor es seronegativo tiene un riesgo de mortalidad de hasta 31%. Para disminuir el riesgo de infección debe tratarse siempre que tanto el donador como el receptor sean seronegativos. Sin embargo esto no siempre es posible<sup>10</sup>.

Si bien la mayor importancia al elegir al donador de CPH reside en la compatibilidad HLA, existen otros factores que influyen en la sobrevida del injerto, como son: la edad, sexo, la patología de base y el tiempo de evolución del paciente<sup>11</sup>

Acorde a un estudio en la Universidad de Washington, Nichols y cols. reportan una estrecha relación con el estado serológico del donador y receptor (D/R), observando que la presencia de complicaciones como neutropenia post-injerto y falla del injerto fueron asociadas a la infección por CMV; la presentación de estas complicaciones se comporto en su población de la siguiente manera: D+/ R+ 17.6%, D-/R+ 20.9%,D+/R- 5.3%,D-/R-1.1%; la neutropenia se presenta

frecuentemente D+/R- 21.1%, D-/R- 18.6%, D+/R+ 35.2%, D- /R+ 43.1%; la falla del injerto ocurre D+/R+ 41.8%, D-/R+ 49.4%, D+/R- 27.1%, D-/R- 24.5%. Así mismo Boeckh y Cols.<sup>12</sup> refieren que el estado serológico tanto del donador como del receptor en el trasplante alogénico de individuos no relacionados si el D+/R- se asoció a un incremento en el riesgo de mortalidad comparado contra aquellos trasplantes que se realizan en D-/ R- .

Ljungman y cols<sup>13</sup> realizaron un estudio en 6,000 pacientes encontrando que el estado serológico para CMV influye en el éxito del trasplante, por lo que recomienda que el estado serológico de donador y receptor sea similar.

La infección por CMV tiene impacto en el desenlace del TCPH. En el caso de las CPH obtenidas de SCU no se cuenta con antecedentes de estudios realizados en nuestro país que determinen la magnitud de riesgo de transmisión vertical y por tanto de transmisión por medio de TCPH.<sup>14</sup>

### **Seroprevalencia en mujeres embarazadas**

La inmunidad contra el CMV en mujeres en edad fértil provee solo protección parcial contra la transmisión intrauterina del virus. La transmisión vertical es debida a la infección primaria en la madre y al estado de latencia del virus, con periodos de replicación y reactivación causando infección recurrente. En el útero la transmisión del CMV al feto quizá sea por infección primaria, sin embargo el daño al feto se observa en la infección recurrente. Se han realizado estudios de seroprevalencia de CMV en mujeres embarazadas encontrando que 56.3% de ellas son positivas para CMV y solo en un 0.4% presentan primoinfección.<sup>15</sup>

La transmisión intrauterina durante la infección primaria en el embarazo ocurre en 30 a 40% de los casos; de éstos solo el 10% de los recién nacidos son sintomáticos y sólo el 10% desarrollan secuelas. En la infección reactiva en la madre el riesgo de infección congénita es muy baja, el índice de transmisión vertical es del 0.2%-2%.<sup>16</sup>

Aunque las vías de transmisión al feto aun son poco conocidas, se tienen reportes que cerca del 15% de las mujeres experimentan infección primaria durante el primer trimestre del embarazo teniendo abortos espontáneos. Si el

curso del embarazo continua, la infección de la placenta con lleva a la infección del feto: la placenta se comporta como un reservorio en donde el CMV se replica y posteriormente infecta al feto. El diagnóstico de infección primaria durante el embarazo es de vital importancia debido a que se asocia a malformaciones congénitas formando parte del síndrome de TORCH<sup>17</sup>

### **Infección Congénita por Citomegalovirus**

De las infecciones congénitas la debida a CMV es la más común y es responsable de retraso mental en infantes. En los Estados Unidos más de 40,000 RN son afectados por año, de estos el 80-95% presentan síntomas al nacimiento. La prevalencia de la infección congénita es variable de acuerdo a la región geográfica y grado de desarrollo de los países donde se han llevado a cabo estudios de seroprevalencia. En países desarrollados la prevalencia reportada es de 0.3% a 2.4% <sup>18</sup>.

### **Métodos para la búsqueda de citomegalovirus en sangre de cordón umbilical. Métodos de detección de CMV**

La transmisión vertical se define como el paso del CMV de una madre infectada al producto, pudiendo ocurrir durante el embarazo, el parto y el período neonatal. La determinación de la transmisión vertical se realiza mediante la detección viral en el binomio madre – hijo. Entre los métodos para la determinación de transmisión vertical se encuentran: serología , cultivo viral y detección de DNA viral.

La determinación serológica basada en la detección de anticuerpos específicos y la interpretación de resultados puede complicarse debido al transporte activo de anticuerpos IgG de la madre al producto de tal manera que el total de anticuerpos positivos para CMV en la madre o en el cordón umbilical, generalmente refleja la exposición del CMV durante la vida de la madre,

La detección de anticuerpos IgM en la madre al mismo tiempo del nacimiento es un marcador de primo infección activa y esto incrementa el riesgo de infección al producto. Un estudio reporta que una de cada tres mujeres con infección primaria durante el embarazo transmiten el virus al feto. La IgM permanece detectable solo entre 4-6 meses. <sup>19</sup>

Es importante hacer notar que los anticuerpos IgM pueden ser indetectables en muchos recién nacidos infectados. El aislamiento del virus en cultivo de orina y saliva se ha considerado como el estándar de oro para la detección de la infección congénita por CMV; el cultivo viral puede ser difícil y costoso por lo tanto no pueda ser llevado a la práctica en gran escala. La prueba de PCR puede detectar DNA del CMV en infección congénita y así permitir la selección de USC útiles para trasplante<sup>20</sup>.

## **4. JUSTIFICACIÓN**

---

Con el advenimiento de la terapia celular y los trasplantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) la utilización de sangre de cordón umbilical ha adquirido gran relevancia en aquellos pacientes que no tienen donador relacionado compatible.

Con esta nueva opción terapéutica es necesario determinar la prevalencia de transmisión vertical ya que la posibilidad de que la unidad de sangre de cordón umbilical se encuentre contaminada depende, entre otros factores, del estado infeccioso de la madre (60-100% tasa de infección, dependiendo de la población estudiada). La prevalencia de transmisión vertical se ha establecido mediante técnicas serológicas pero no por biología molecular.

Establecer la prevalencia de la transmisión vertical permitiría implementar medidas de prevención considerando la alta morbi-mortalidad asociada a CMV en el paciente trasplantado.

### **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

No se conoce la frecuencia de unidades de sangre de cordón umbilical positivas para Citomegalovirus en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Medico Nacional "La Raza".

**¿Cual es la frecuencia de la trasmisión vertical del citomegalovirus (CMV) en unidades de sangre de cordón umbilical?**

### **7. OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la frecuencia de la transmisión vertical de Citomegalovirus en unidades de sangre de cordón umbilical.

#### **7.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

Determinar la frecuencia de la transmisión vertical de citomegalovirus (CMV) mediante la detección de segmentos específicos de ácidos nucleicos por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**8. HIPOTESIS:** La frecuencia de transmisión vertical de citomegalovirus (CMV) es similar a la reportada en países similares al nuestro.

## **9. MATERIAL Y METODOS**

### **SUJETOS DE ESTUDIO:**

\*Donadoras de Sangre de Cordón Umbilical positivas a CMV.

\*Unidades de sangre de cordón umbilical de donadoras positivas a CMV.

### **VARIABLE INDEPENDIENTE.**

\* Donadoras de Sangre de Cordón Umbilical positivas a CMV.

### **DEFINICION CONCEPTUAL**

Toda aquella mujer donadora de sangre de cordón umbilical con resultado positivo a CMV mediante la amplificación de los segmentos de ácidos nucleicos de las proteínas virales.

### **DEFINICION OPERACIONAL**

Toda aquella mujer donadora de sangre de cordón umbilical con resultado positivo a CMV determinada por la amplificación de los segmentos de ácidos nucleicos de proteínas virales tempranas, IE1, MCP mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Técnica anexo 1)

**Escala de medición:** nominal dicotomica

**INDICADORES.** Si o No.

### **VARIABLE DEPENDIENTE**

Transmisión vertical de Citomegalovirus

### **DEFINICION CONCEPTUAL:**

Capacidad de transmisión de agentes infecciosos de la madre al producto durante el embarazo, el parto o el periodo neonatal.

### **DEFINICION OPERACIONAL:**

Capacidad de transmisión del CMV de la madre al producto durante el embarazo y el parto, determinada por la presencia de los segmentos de ácidos nucleicos de las proteínas virales tempranas, IE1 y MCP de Citomegalovirus en Sangre de Cordón Umbilical, de madres positivas a CMV, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**ESCALA DE MEDICION:** Nominal Dicotomica.

**INDICADORES.** Sí ó No.

**CRITERIOS DE INCLUSION:**

Mujer donadora de sangre de cordón umbilical con infección por citomegalovirus determinada por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .

**CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

Mujer donadora de Sangre de Cordón Umbilical con comorbilidad a Hepatitis C, B, VIH o Sífilis.

**CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

Imposibilidad técnica para realizar las pruebas.

**DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO:**

1. Capacitación de médico residente en la realización de la técnica de PCR en el departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV)
2. Extracción de DNA de muestras sanguíneas del binomio madre – hijo obtenidas de la seroteca del Banco de Sangre de Cordón Umbilical del CMNR. Este procedimiento se llevó a cabo en la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología del CMNR.
3. Detección de DNA de CMV en muestras maternas mediante técnica de PCR para determinar las muestras con positividad a la prueba.
4. Selección de las muestras de DNA de sangre de cordón umbilical correspondientes a las muestras maternas positivas a CMV.
5. Detección de DNA de CMV mediante técnica de PCR en las muestras de sangre de cordón umbilical seleccionadas.
6. Comparación de positividad a CMV entre muestras maternas y de sangre de cordón umbilical
7. Determinación de la tasa de transmisión vertical de infección por CMV.

**DISEÑO:**

Observacional, Transversal, Descriptivo, Prospectivo, Comparativo.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.**

Mediante estadística descriptiva y tablas de frecuencia así como el cálculo del OR con el programa informático SPSS versión 15.

### **TAMAÑO DE MUESTRA**

Considerando una prevalencia estimada de transmisión vertical de infección por CMV de 2.5% se calculó el tamaño de muestra en sistema Epi-Info con resultado de 342 sujetos. Se realizó estudio piloto con 40 muestras (20 maternas y 20 de sangre de cordón umbilical).

### **CONSIDERACIONES ETICAS**

El protocolo se envió para revisión al Comité Local de Investigación del Hospital de Especialidades CMNR. Este estudio se apega a la normativa de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud y con la Declaración de Helsinki y sus enmiendas con el código de Nuremberg y el informe de Belmont.

Dado que este proyecto deriva de un Programa Institucional en el cual durante la valoración médica la donadora de sangre de cordón umbilical recibe información acerca de los estudios de laboratorio a realizar, tanto en las muestras maternas como en las de cordón umbilical, firmando una carta de consentimiento informado que incluye la autorización para los estudios de investigación requeridos (VIH; Hepatitis B, C, Sífilis y CMV). Se le informará a la donadora en caso de transmisión vertical de CMV para que se tomen las medidas de prevención necesarias y se respetará la confidencialidad del binomio madre-hijo.

**RECURSOS.:** Se contó con los recursos humanos y físicos necesarios para la realización del estudio aportados por el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza, el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y de la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza.

## RESULTADOS

De las 20 muestras maternas estudiadas 19 (95%) fueron positivas para las proteínas IE1 y MCP del CMV. CMV lo que equivale al 95% de la población, siendo por lo tanto el 5% negativo (una disponente sanguínea). De las 20 muestras de sangre de cordón umbilical correspondientes 2 (10%) fueron positivas a las proteínas del CMV. La imagen No. 1 muestra las bandas de proteínas virales IE1 en gel de agarosa teñida con bromuro de etilo.

La prevalencia de transmisión vertical de CMV es de 10%

Se estudiaron 20 disponentes maternas serologicamente positivas a CMV junto con la sangre de cordón umbilical proveniente de sus productos (20).

Se realizó PCR a todas las muestras encontrando lo siguiente (Imagen1):

De las 20 disponentes maternas fueron 19 positivas para las proteínas virales IE1 y MCP

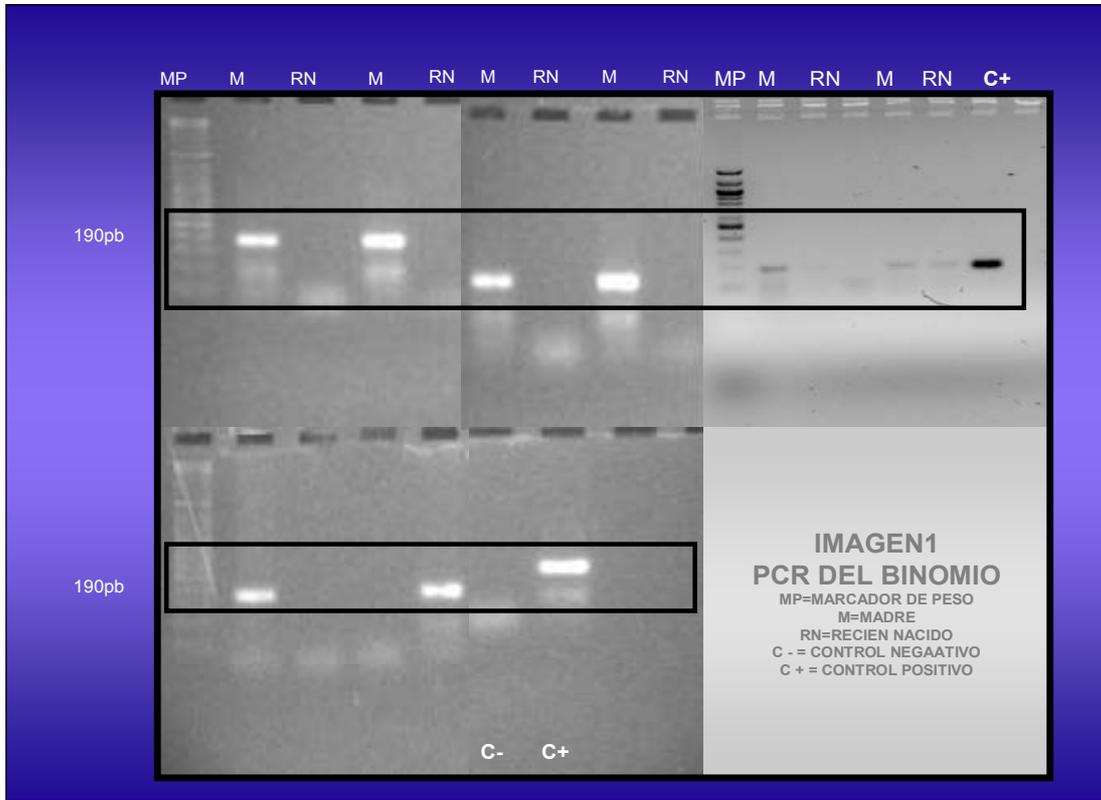
De la sangre de cordón umbilical se encontró que 2 fueron positivas a las proteínas virales IE1 y MCP, lo que equivale al 10% de la población y 18 fueron negativas (90% de la población).

Ver grafico 1 y 2.

Se realizó el cálculo del OR siendo de 0.1.

# IMAGEN 1

## IE1



## IE1

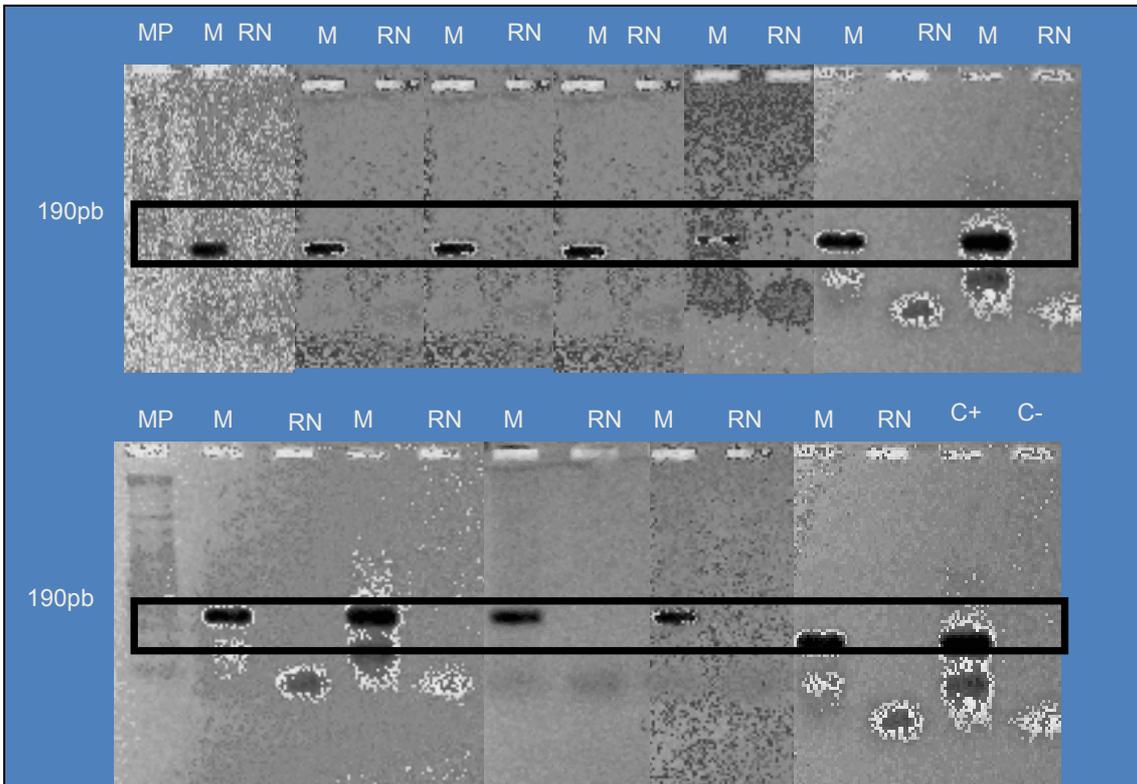
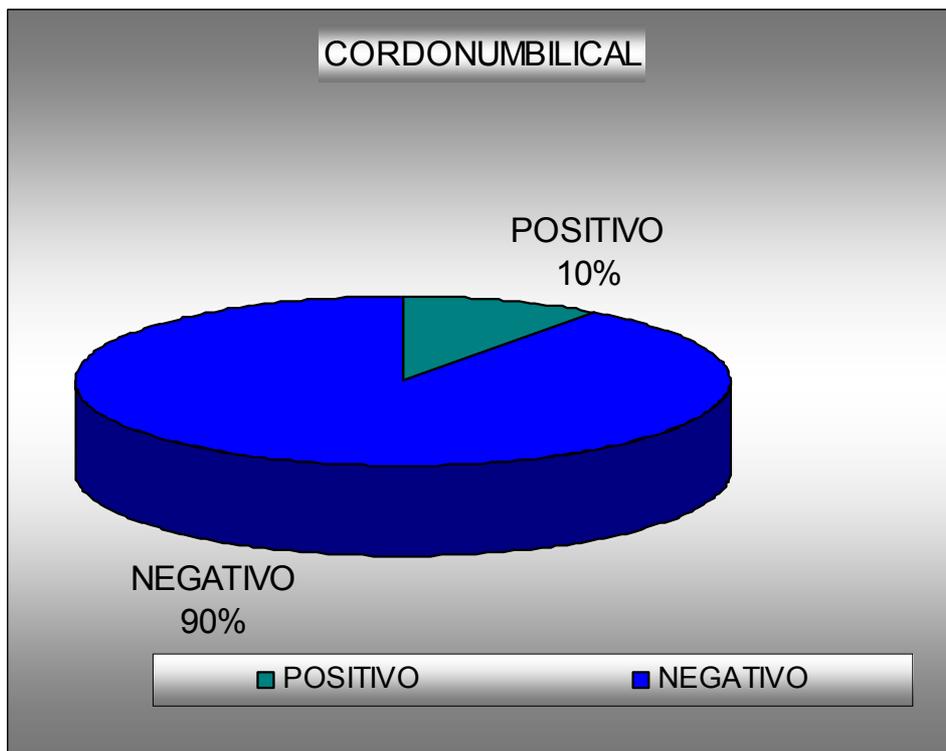
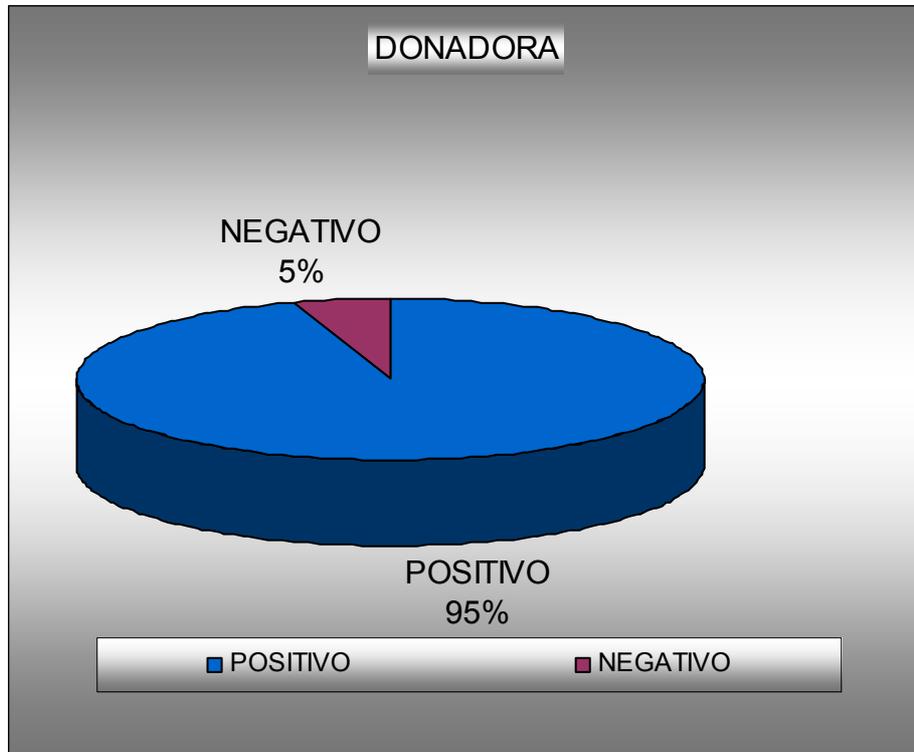


GRAFICO 1 Y 2.



## DISCUSION

En este estudio piloto la tasa de transmisión vertical de infección por CMV es de 10%, la cual es mayor a la reportada en países desarrollados que es de 0.2 a 2%, pero similar a la reportada en países en vías de desarrollo como el nuestro.

Este resultado debe ser tomando en cuenta de manera cautelosa ya que se trata de un estudio piloto por lo que en una segunda etapa deberá calcularse un tamaño de muestra en función de esta tasa de transmisión.

De manera provisional se puede considerar que las CPH obtenidas de sangre de cordón umbilical tienen menor riesgo de transmisión de infección por CMV cuando se les compara con las CPH obtenidas de médula ósea o de sangre periférica movilizada, que al ser obtenidas en individuos fuera del periodo neonatal presentan tasas de infección de 73%.

Adicionalmente es recomendable mantener la detección de CMV en las unidades de CPH de sangre de cordón umbilical como prueba de tamizaje hasta tener una imagen más completa de la situación de riesgo que pudieran significar estas unidades en el contexto del trasplante de CPH.

Además de que el riesgo de transmisión de este virus por transfusión de estas es bajo, por lo que una infección en el paciente trasplantado puede ser adjudicada con mayor posibilidad a la reactivación de la infección en el paciente y no debido al trasplante de SCU.

En base a estas observaciones la recomendación debe ser el estudio del receptor y de la USC ya que aunque el riesgo de transmisión es bajo, existe; y el que un receptor sea serológicamente negativo justifica el aseguramiento de la búsqueda de una unidad CMV negativa para brindarle la mayor posibilidad de éxito del trasplante.

**CONCLUSIONES:** En este estudio piloto la tasa de transmisión vertical de infección por CMV es de 10%, la cual es mayor a la reportada en países desarrollados que es de 0.2 a 2%, pero similar a la reportada en países en vías de desarrollo como el nuestro.

De manera provisional se puede considerar que las CPH obtenidas de sangre de cordón umbilical tienen menor riesgo de transmisión de infección por CMV cuando se les compara con las CPH obtenidas de médula ósea o de sangre periférica movilizada, que al ser obtenidas en individuos fuera del periodo neonatal presentan tasas de infección de 73%. Por lo que la búsqueda de DNA esta justificada debido a que existen receptores CMV negativos, los cuales se ha demostrado que tienen mejor pronóstico TCPH CMV negativas.

## **BIBLIOGRAFIA.**

1. De Bolle L, Naesens L, Clercq E. Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy. *Clinical Microbiology Reviews* 2005;18(1):217-45.
2. Goodrum F, Jordan CT, Terhune SS, High K, Shenk T. Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cells subpopulations. *Blood* 2004;104 (3):687-95.
3. Jaber S, Chanques G, Borry J, Souche B, Verdier R, Perrigault PF, et al. Cytomegalovirus Infection in Critically Patients: Associated Factors and Consequences. *Chest* 2005;127:233-41.
4. Ljungman P,  $\beta$ - Herpesvirus Challenges in the Transplant Recipients. *J Infect Dis* 2002;186:99-109
5. Baeck J, Hun K. Adoptive immunotherapy for cytomegalovirus disease in immunocompromised patients. *Yonsei Med J* 2004;45:18-22
6. Sánchez V, Greis KD, Sztul E, Brito W. Accumulation of Virion Tegument and Envelope Proteins in a Stable Cytoplasmatic Compartement during Human Cytomegalovirus Replication: Characterization of a Potential Site of Virus Assembly. *J Virol* 2000;74 (2):975-86.
7. Kinzler E, Compton T, Characterization of Human Cytomegalovirus Glycoprotein-Induced Cell-Cell Fusion. *J Virol* 2005;79(12):7827-37.
8. Tabi Z, Moutaftsi M, Borysiewicz. Human Cytomegalovirus pp65- and Immediate Early 1 Antigen- Specific HLA Class I- Restricted Cytotoxic T Cell Responses Induced by Cross- Presentation of Viral Antigens. *Immunology* 2001; 166: 5695-5703.
9. Fortunato EA, Sanchez V, Yen JY, Spector DH, Infection of Cells with Human Cytomegalovirus during S Phase Results in a Blockade to

- Immediate-Early Gene Expression That Can Be Overcome by Inhibition of the Proteasome. *J Virol* 2002;76(11):5369–79
10. Behzad-Behbahni A, Pouransari R, Tabei SZ, Rahiminejad MS, Robati M, Nourani, et al, Risk of Viral Transmisi3n Via Bone Marrow Progenitor Cells Vs Umbilical Cord Blood Haematopoietic Stem Cells in Bone Marrow Transplantation. *Transplant Proc* 2005;37:3211-12
  11. Saavedra S, Sanz GF, Jarque I, Moscardo F, Jim3nez C, Lorenzo I. Early infections in adult patients undergoing unrelated donor cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2002;30:937-43.
  12. Nichols W.G, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh. High Risk of Death Due to Bacterial and Fungal Infection among Cytomegalovirus (CMV) – Seronegative Recipients of Stem Cell Trasplants from Seropositive Donors: Evidence for Indirect Effects of Primary CMV Infection. *J Infect Dis* 2002;185:273-82.
  13. Boekch M, Garrett N. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 2004;103(6):2003-08.
  14. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood* 2003;102(13):4255-60.
  15. Alanen A, Vahlberg KK, Koskela T, Vainionp33 P. Seroprevalence, incidence of prenatal infections and reliability of maternal history of varicella zoster virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus and parvovirus B19 infection in South-Western Finland. *BJOG*.2005;112(1): 50-6
  16. Staras S, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ, Seroprevalence of Cytomegalovirus Infectio in the United States, 1988–1994 *Clin Infect Dis* 2006; 43:1143–51.

17. Fisher S, Genbaceb O, Maidji E, Pereira L. Human Cytomegalovirus Infection of Placental Cytotrophoblasts In vitro and In Utero: Implications for transmission and Pathogenesis. *J Virol* 2000;74(15):6808- 20.
18. Peckham C, Tookey P, Logan S, Giaquito C. Screen options for prevention of congenital cytomegalovirus infection. *Journal Med Screen* 2001;8:119-24
19. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Application. *Clin Microbiol Rev* 1998: 533–554
20. Gault E, Michel Y, Dehe'e A. Quantification of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time PCR. *JCM*, 2001;772–775

## **ANEXO 1**

### **METODOLOGÍA.**

#### **Separación y congelación.**

Se procederá a tomar una muestra materna de 3 ml y una muestra de sangre de cordón umbilical de 1 ml, se separa el plasma POR CENTIFUGACION y se alícuota Y SE CONGELA A  $-25^{\circ}\text{C}$ , luego se procede a la lisis de eritrocitos CON CLORURO DE MAGNESIO AL .5 mM con la finalidad de preservar solo las células nucleadas, estas se congelaran a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción del DNA viral y la realización de la PCR.

Se rotulan dos tubos para plasma y dos tubos para células con el nombre de la donadora y/o el código, indicar que la muestra es materna.

Rotular dos tubos para plasma y dos tubos para células con el nombre de la donadora y/o el código, indicar que la muestra es de sangre de cordón umbilical. Una vez separado el plasma por centrifugación el paquete celular se pasa a un tubo falcón graduado de 50 ml, se afora a 20 ml con una solución de  $\text{MgCl}_2$  al 5 Mm y homogeneizar se centrifuga a 3100 rpm. A  $4^{\circ}\text{c}$  durante 10 minutos, se decanta el sobrenadante cuidando no arrastrar el paquete celular.se vuelve a aforar hasta 20ml. Con cloruro de magnesio al 5 Mm. Y homogenizar. y se Centrifuga nuevamente a 3100rpm. A  $4^{\circ}\text{c}$  durante 10 minutos.

De nuevo se decanta el sobrenadante cuidando no arrastrar el paquete celular., se reconstituye el paquete celular con cloruro de magnesio al 5 Mm. (Aprox 1ml.) y colocar 1ml. De la suspensión en los criotubos marcados los cuales se Guardan a  $-25^{\circ}\text{c}$  para posteriormente realizar la extracción del DNA del CMV.

Una vez que se hayan reunido las muestras y estén en congelación a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Se procederá a realizar la extracción del DNA de la alícuota de la de celulas mediante el siguiente procedimiento:

## **Técnica de extracción de DNA viral ( High Pure Viral Nucleic Acid Kit )<sup>MR</sup>**

1. **Se toman 200 µl** de la suspensión de células, preparada anteriormente en un tubo ependorf de 1.5 ml y se procede a realizar la extracción como lo establece el fabricante.
2. Agregarle **200 µl** de solución de trabajo ( **Binding Buffer**, suplementado con poly A ) recién preparada y **50 µl de ProteinKinasa**.
3. Mezclar manualmente.
4. Incubar por **10 minutos en termoblock a 73°C**.
5. Luego de la incubación a gregarle **100 µl de Binding Buffer**.
6. Mezclar.
7. Vaciar el contenido de la mezcla del tubo ependorf ( 550 µl en total) a la columna de separación, la cual se inserta en un tubo colector
8. **Centrifugar a 8,000g por 1 minuto**
9. Descartar el tubo colector y el líquido
10. Colocar la columna de separación en un nuevo tubo colector.
11. Agregar **500 µl de Inhibidor Renoval Buffer** en la columna de separación.
12. **Centrifugar a 8,000g por 1 minuto**
13. Descartar el tubo colector y el líquido
14. Colocar la columna de separación en un nuevo tubo colector.
15. Agregar **450 µl de Wash Buffer** en la columna de separación.
16. **Centrifugar a 8,000g por 1 minuto**
17. Descartar el tubo colector y el líquido
18. Colocar la columna de separación en un nuevo tubo colector.
19. Agregar **450 µl de Wash Buffer** en la columna de separación
20. **Centrifugar a 8,000g por 1 minuto**
21. **Centrifugar a 13,000g por 10 segundos para eliminar el Wash Buffer**
22. Descartar el tubo colector y el líquido
23. Colocar la columna de separación en un tubo ependorf limpio de 1.5 ml
24. Agregar **50 µl de Elution Buffer** en la columna de separación
25. **Centrifugar a 8,000g por 1 minuto**
26. El Elution Buffer que pasó a través de la columna (50 µl) contiene el DNA y el RNA extraído, guardarlo en el mismo tubo ependorf a -25 °C. Hasta el proceso de amplificación de la muestra.

**TECNICA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA ( PCR)  
PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LAS PROTEINAS VIRALES IE-1 (UL 123)**

**1. Se realiza mezcla en un tubo ependorff de 1.5 mL de los siguientes reactivos:**

- 10 X Buffer de Taq (KCl, -MgCl<sub>2</sub>)..... 2.5 µL por muestra.
- Mg Cl a 25 Mmol ..... 0.75 µL por muestra
- -dNTPs ..... 1.5 µL por muestra
- Iniciadores..... 1 µL por muestra.
- Taq polimerasa..... 0.25 µL por muestra.
- H<sub>2</sub>O (sol. Inyectable) .....14.5 µL por muestra.
- DNA geonómico..... 2 µL de cada muestra.
- A un volumen final de..... 25 µL de reacción.

**2. Se amplifica a las siguientes temperaturas.**

Precaentamiento 94<sup>0</sup> C

35 ciclos de:

94<sup>0</sup> C x 30 seg

58.8<sup>0</sup> C x 30 seg

72<sup>0</sup> C x 30 seg

un ciclo de 72<sup>0</sup> C por 7 minutos

**3. Una vez terminada la amplificación IE-1(UL123) se realizara una PCR anidada en las siguientes condiciones:**

Se realizara un dilución 1:10 del producto de la primera PCR

a) 9 µL de agua inyectable + 1 µL del producto de PCR

b) Tomar 2 µL y realizar nuevamente amplificación por PCR

- 10 X Buffer de Taq (KCl, -MgCl<sub>2</sub>)..... 2.5 µL por muestra.
  - Mg Cl a 25 Mmol ..... 0.75 µL por muestra
  - -dNTPs ..... 1.5 µL por muestra
  - Iniciadores..... 1 µL por muestra.
  - Taq polimerasa..... 0.25 µL por muestra.
  - H<sub>2</sub>O (sol. Inyectable) .....14.5 µL por muestra.
  - Producto de la dilución 1:10..... 2 µL de cada muestra.
- A un volumen final de..... 25 µL de reacción

Pre calentamiento 94<sup>0</sup> C

35 ciclos a las siguientes temperaturas:

94<sup>0</sup> C x 30 seg

65<sup>0</sup> C x 30 seg

72<sup>0</sup> C x 30 seg

un ciclo de 72<sup>0</sup> C por 7 minutos

**Se valorará la presencia del DNA viral a través de un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio**

**En cada pozo se pondran 6µL de volumen final**

a) 1µL de Buffer de Carga 6X Loading Dye

b) 5 µL de muestra ya amplificada

c) 3.5 µL Marcador de Peso Orange Ruler 100bp-700bp

Se realizará la visualización de las bandas de amplificación de 190 pb A través de la exposición a luz UV.

**4. La presencia de las 1 bandas significa positivo para IE-1 (UL123)**

**Secuencia de los Iniciadores o Primers**

**Sentido..... GACGGAAGAGAAATTCACCTGGCGC**

**Antisentido... GCAGCCATTGGTGGTCTTAGGGAA**

**Secuencia de los Iniciadores o Primers de la PCR Anidada**

**Sentido.... AGGTTTCATGAGCCTTTTCGAGGA**

**Antisentido... TCCTTTTTAGCACGGGCCTTAG**

**TECNICA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA ( PCR)  
PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LAS PROTEINA VIRAL MCP (pp65)**

**1. Se realiza mezcla en un tubo ependorff de 1.5 ml de los siguientes reactivos:**

- 10 X Buffer de Taq (Kcl, -MgCl<sub>2</sub>)..... 2.5  $\mu$ l por muestra.
- Mg Cl a 25 Mmol ..... 1.5  $\mu$ l por muestra
- -dNTPs ..... 1.5  $\mu$ l por muestra
- Iniciadores..... 1  $\mu$ l por muestra.
- Taq polimerasa..... 0.25  $\mu$ l por muestra.
- H<sub>2</sub>O (sol. Inyectable) .....14.5  $\mu$ l por muestra.
- DNA geonómico..... 2  $\mu$ l de cada muestra.
- A un volumen final de..... 25  $\mu$ l de reacción.

**2. Se amplifica a las siguientes temperaturas.**

Pre calentamiento 94<sup>0</sup>

35 ciclos de:

94<sup>0</sup> C x 30 seg

65<sup>0</sup> C x 30 seg

72<sup>0</sup> C x 30 seg

un ciclo de 72<sup>0</sup> C por 7 minutos

**3. Una vez terminado la amplificación se valorará la presencia del DNA viral a través de un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio**

**En cada pozo se pondran 6 $\mu$ L de volumen final**

a) 1 $\mu$ L de Buffer de Carga 6X Loading Dye

c) 5  $\mu$ L de muestra ya amplificada

d) 3.5  $\mu$ L Marcador de Peso Orange Ruler 100bp-700bp

e) Se realizará la visualización de las bandas de amplificación de 600 bp. A través de la exposición a luz UV.

**4. La presencia de las 1 bandas significa positivo para MCP (pp65)**

**Secuencias de los Iniciadores o Primers.**

**Sentido..... GTGATCCGACTGGG**

**Antisentido..... GAGCGCGTCCACAAAGTC**



**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN  
ALTRUISTA DE SANGRE PROVENIENTE DE CORDÓN UMBILICAL**

México, D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 200\_\_

**ACEPTO QUE:**

- Se me tome una muestra de sangre para efectuar examen de serología infecciosa (VIH, Hepatitis B y C, Sífilis, **CMV**) y posteriormente los resultados serán manejados en forma confidencial.
- Cualquier alteración detectada en mis estudios me será notificada oportunamente por el médico del Banco Central de Sangre CMN La Raza y seré derivada a donde corresponda para mi atención médica.
- Entiendo que los riesgos por participar en este programa son nulos y sin molestias tanto para mí como para mi hijo(a).
- He sido informada que la sangre de cordón umbilical obtenida, en caso de cumplir con los estándares nacionales e internacionales, será utilizada en el Programa de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas en beneficio del paciente del Instituto Mexicano del Seguro Social u otra institución de salud que lo requiera, así como con fines de investigación por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Se me ha explicado de forma clara y amplia en qué consiste mi participación y los beneficios que de ésta derivan.
- Entiendo que en caso de que la sangre recolectada no sea adecuada para su utilización, será desechada de acuerdo a la normatividad vigente.
- Se me ha dado información sobre el programa de donación altruista y se ha respondido a las preguntas que he realizado, aclarando todas mis dudas.
- El médico del Banco Central de Sangre del CMN La Raza me llamará telefónicamente en un lapso aproximado de tres meses posterior al nacimiento de mi hijo(a) para solicitar información sobre su estado de salud.
- No se identificará a mi persona ni la de mi hijo(a) en las presentaciones o publicaciones que se deriven del programa, y que los datos míos y de mi hijo(a) serán manejados de manera confidencial.
- Estoy conciente que puedo renunciar en cualquier momento a mi participación en el programa, sin menoscabo de la atención médica que requiera.
- He leído y comprendido toda la información proporcionada.
- Deseo participar de forma informada, libre y voluntaria en este programa.
- Toda la información derivada de la sangre de cordón umbilical y de mi persona será confidencial.
- Los resultados de laboratorio me serán entregados por escrito en un lapso de 10 días posteriores al nacimiento de mi hijo(a), a través de Relaciones Públicas del Hospital.
- Se podrán tener en almacenamiento muestras de sangre de cordón umbilical para estudios futuros.

**ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN EL PROGRAMA DE DONACIÓN DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL UNA VEZ QUE HE LEÍDO Y COMPRENDIDO LA INFORMACIÓN QUE SE ME HA PROPORCIONADO.**

Nombre y firma de la madre

Nombre y firma del médico

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Testigo

Testigo

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre y firma

Nombre y firma