

ALFA-1 FETOPROTEINA EN EL DIAGNOSTICO PRENATAL DE MALFORMACIONES CONGENITAS

Auramarina Villalobos de Roldán,* Lía Angarita**
y Francisco González Govea***

RESUMEN

Se estudiaron 150 muestras de líquido amniótico, tomadas por amniocentesis trans-abdominal, en mujeres entre 16,40 y más semanas de gestación, donde se determinó la presencia de alfa 1-fetoproteína (AFP), con la finalidad de ver si su presencia tenía relación con la aparición de alguna malformación en el producto de ese embarazo.

La determinación se hizo mediante la técnica de inmunodifusión simple, modificada por Hernández y cols. La cuantificación se hizo por el método de inmunodifusión radial.

Se pudo demostrar: a) que cuando la muestra de líquido amniótico es contaminada con sangre fetal, la AFP puede ser positiva, y no acompañarse de malformación alguna; b) que en algunos casos de malforma-

* *Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.*

** *Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.*

*** *Cátedra de Ginecología y Obstetricia, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.*

ciones del sistema nervioso central, como la anencefalia, los niveles de AFP en líquido amniótico pueden ser normales, c) que todos los casos de isoimmunización estudiados se acompañaron de niveles normales de AFP.

De los resultados obtenidos se concluye que: a) en toda mujer con embarazo de alto riesgo, sobre todo si se sospecha de alguna malformación congénita, debe determinarse la presencia de AFP en líquido amniótico, más aún si tomamos en cuenta que la técnica es sumamente sencilla y fácil de realizar; b) la muestra de líquido amniótico no debe estar contaminada con sangre; en caso contrario debe investigarse si los eritrocitos presentes en la muestra son eritrocitos fetales, c) en todos los casos positivos debe tomarse una nueva muestra para repetir la prueba, y si aún continúa positiva, se debe ayudar al diagnóstico definitivo con la sonografía y amniografía, antes de tomar una decisión electiva de interrupción del embarazo.

INTRODUCCION

La alfa 1-fetoproteína (AFP) es una glucoproteína que se encuentra en el suero humano fetal, pero no en el suero de niños o adultos normales (10, 23). Esta proteína ha sido observada por algunos autores en el suero de fetos humanos desde las 6 a 14 semanas de gestación y se ha demostrado que su concentración disminuye a medida que avanza la gestación (10, 13, 23, 38, 39, 41, 61, 67).

Muralt y Roulet (57) encontraron por inmunoelectroforesis, que al poner en contacto el suero fetal humano con suero de conejo-antisuero fetal, aparecía una banda de precipitación correspondiente a la alfa 1-globulina, la cual desaparecía del suero fetal a la vigésima semana de vida intrauterina. Luego Masopust (53) estudió esta proteína en el suero de cordón de recién nacidos, encontrándola hasta una semana después del nacimiento.

La AFP es una glucoproteína de la clase de las alfa 1-globulinas, cuyo peso molecular oscila entre 64.000 y 72.000 y su constante de sedimentación es de 55 S (1, 31, 61, 68). Está compuesta por 3 a 4% de hidratos de carbono y trazas de ácido siálico (1, 31, 61, 68) y no contiene galactosa (13, 38, 39), a diferencia de la AFP descubierta por Pedersen (64) en el suero bovino fetal, quien la consideró una proteína embrionaria-específica; la cual, por estar ausente en el animal adulto, le dió el nombre de fetuína y la cual sí contiene galactosa.

Bodman (16) ha sugerido que la AFP presente en fetos humanos de 4 meses de gestación es la misma fetuina, pero libre de galactosa, y él ha reportado que después de los 4 meses de gestación la AFP adquiere galactosa y puede reaccionar con antisueros preparados contra la fetuina bovina. Por otro lado, Murali y Roulet (57) han obtenido reacción de precipitación entre la fetuina bovina y el antisuero contra AFP sérica humana.

Se ha demostrado que la AFP es sintetizada por el hepatocito y saco embrionario, tejido gastrointestinal, riñón fetal, tejido placentario, etc; y es secretada al suero registrándose su máxima concentración durante el primer trimestre de vida intrauterina (33, 34, 36). Gitlin (35), ha reportado los siguientes valores en el suero de fetos: a— 6 semanas: 6,65 mgr/%, b— 13 semanas: 270 mgr/%, c— 18-22 semanas: 8 mgr/%. En el líquido amniótico de embarazadas normales: 10-14 semanas: x: 20 μ gr/ml (rango 4-36 μ gr/ml), 15-18 semanas: x: 15 μ gr/ml (rango 4-32 μ gr/ml), 19-22 semanas: 6,5 μ gr/ml (rango 2-16 μ gr/ml). Según el autor, esta estimación debe ser confirmada usando mayor número de embarazadas normales y utilizando también un estandar internacional.

En la vida fetal temprana la AFP representa el 90% del total de las seroglobulinas. Algunas de sus características físico-químicas son similares a la albúmina (8), sin embargo, sus funciones en el período embrionario no se conocen con exactitud; se piensa que juega un papel importante en la protección del feto contra el ataque inmunológico de la madre, y que además tiene una función inmunorreguladora en el desarrollo normal del feto (58, 59). Su concentración aumenta durante el primer trimestre de gestación y los niveles bajan en el recién nacido, y tiende a desaparecer con una vida media de 3 días (33), pudiéndose detectar hasta las 3 primeras semanas de vida (2), e incluso Masseyeff (citado por Adinolfi y col (23)) la ha podido detectar en un pequeño porcentaje de niños normales hasta cerca de un año de edad. Se ha reportado que con el radioinmunoanálisis, por inhibición competitiva, se pueden detectar trazas en pacientes normales (66, 69, 70).

Alpert y cols. (8) encontraron la existencia de esta proteína en dos formas distintas, según su comportamiento electroforético. Las dos formas moleculares han sido encontradas en la mayor parte de los sueros de fetos y en hepatomas primitivos (31). Se ignora si estas dos formas de AFP son dos proteínas diferentes o si ellas corresponden a variaciones alomórficas por modificación de la estructura secundaria o terciaria de las proteínas, o si ambas son determinadas por cambios después de su síntesis.

La síntesis de AFP parece ocurrir en el hombre, por lo menos en el hígado fetal, y se forman en el hepatoblasto y no en el hepatocito diferen-

ciado y en ciertos tejidos cancerosos entre los cuales el hepatoma primitivo es el más frecuente (34); por el contrario, la proteína no parece ser sintetizada en cerebro, pulmón, músculo cardíaco y esquelético, y piel (31).

La producción de AFP por ciertos tejidos cancerosos y sobre todo el hepatoma primitivo ha sido demostrado por diferentes autores (3, 5, 7-9, 11, 15, 17, 27, 42, 44, 47, 54, 56, 62, 83).

Estudios recientes han permitido comprobar la presencia de AFP en el curso de algunas enfermedades hepáticas no neoplásicas (26, 41, 42, 45, 82), tales como hepatitis viral, absceso hepático amibiano, e incluso en niños con anemia refractaria (Hernández M, Roldán A de, Rodríguez F, García F y Kumate J, por publicar), en los que existían alteraciones del funcionamiento hemático, secundario al tratamiento con anabólicos. También ha sido posible detectar en pacientes con algunas inmunodeficiencias tales como ataxia telangiectásica (2, 81, 84), donde la persistencia de esta proteína es compatible con la hipótesis de que el principal defecto de estos pacientes es una anomalía en el tejido de diferenciación.

Según Stillman y Zamcheck (83) la frecuencia de pruebas positivas séricas puede ser relacionada con factores que favorecen la aparición del hepatoma como son: cirrosis, malnutrición, etilismo, parasitosis, etc.

La AFP también ha sido detectada en líquido amniótico de embarazadas normales (33), en meconio, orina, líquido cefalorraquídeo y bilis de fetos humanos (2).

En 1964 Tatarinov (citado por Adinolfi y col (2)) detectó AFP en el suero de un gran porcentaje de mujeres después de abortos espontáneos, esta proteína pudo ser detectada en un 50% de mujeres con embarazo normal después de 30 semanas de gestación (18-21, 28, 29, 75).

Se ha visto que esta proteína fetal desaparece del suero materno una semana después del parto, lo que sugiere que ella deriva del feto; sin embargo, hay otra alternativa posible, y es de que los cambios hormonales del embarazo causan temporalmente una de-represión de la síntesis de AFP; quizás esta situación es similar a lo observado en mujeres que toman anticonceptivos (75).

Brock y otros investigadores (4, 18-21, 23, 25, 40, 46, 48-50, 55, 72-74, 76, 77, 80, 86, 87), en estudios retrospectivos, han mostrado que la presencia de AFP en líquido amniótico podía servir para hacer un diagnóstico "in útero" de malformaciones congénitas: anencefalia, espina bífida, atresia

esofágica, nefrosis, atresia duodenal, onfalocele, hidrocefalia, etc; de allí que hoy se le esté dando mucha importancia a su determinación en el líquido amniótico de mujeres con embarazo de alto riesgo y en todos aquellos casos donde se sospeche de malformaciones congénitas, con el fin de obtener un diagnóstico prenatal de dichas malformaciones.

Su determinación es de gran ayuda y quizás constituye un procedimiento diagnóstico rutinario para estos casos, situación ésta que nos motivó a realizar el presente estudio, dado que en nuestro medio no es una técnica utilizada de rutina a pesar de ser sumamente sencilla y fácil de realizar y sobre todo si tomamos en cuenta la utilidad que pueda tener en casos de malformaciones graves, como es el de la anencefalia.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 150 muestras de líquido amniótico, tomadas por amniocentesis trans-abdominal, en mujeres entre 16,40 y más semanas de gestación. La mayoría de estas muestras fueron recibidas en el Laboratorio, para estudio genético prenatal. Estas muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 2.000 rpm, y el sobrenadante claro fué guardado en refrigeración (4-8°C) hasta el momento de ser procesado.

Las muestras de líquido amniótico fueron divididas en 3 grupos (Tabla I). **Grupo I:** Muestras provenientes de embarazos en mujeres con antecedentes de hijos con malformaciones del sistema nervioso central (4 casos). **Grupo II:** Muestras provenientes de embarazos en mujeres con isoimmunización (3 casos). **Grupo III:** Muestras provenientes de embarazos normales, las cuales fueron enviadas para ser estudiadas por otra razón. Ej: madurez fetal, sexo, etc. (143 casos).

En todas las muestras de líquido amniótico se determinó la presencia de AFP, mediante la técnica de inmunodifusión, modificada por Hernández y cols (41, 42). Estos autores, al modificar las proporciones de combinación entre antígeno y anticuerpo, mostraron que había mayores posibilidades de detectar bandas de precipitación.

Se utilizó un antisuero comercial anti-alfafetoproteína (Behringwerke, A.G. K-Batch N° 2942 D).

La especificidad y pureza del antisuero fue probada mediante la técnica de inmunoelectroforesis (37, 71, 88), utilizando como antígeno alfa 1-fetoproteína comercial (Behringwerke, A.G. K-Batch N° 11 D) y suero de un paciente con hepatoma. Por medio de la prueba de Ouchterlony (63), se investigó la identidad de las bandas de precipitación (Fig. 1)

TABLA I

ANTECEDENTES OBSTETRICOS DE LA MADRE

Grupo	Antecedentes	Número de casos	Porcentaje
I	Malformaciones del sistema nervioso central	4	3,0
II	Isoinmunización	3	2,0
III	Embarazo normal	143	95,0
TOTAL'		150	100,0

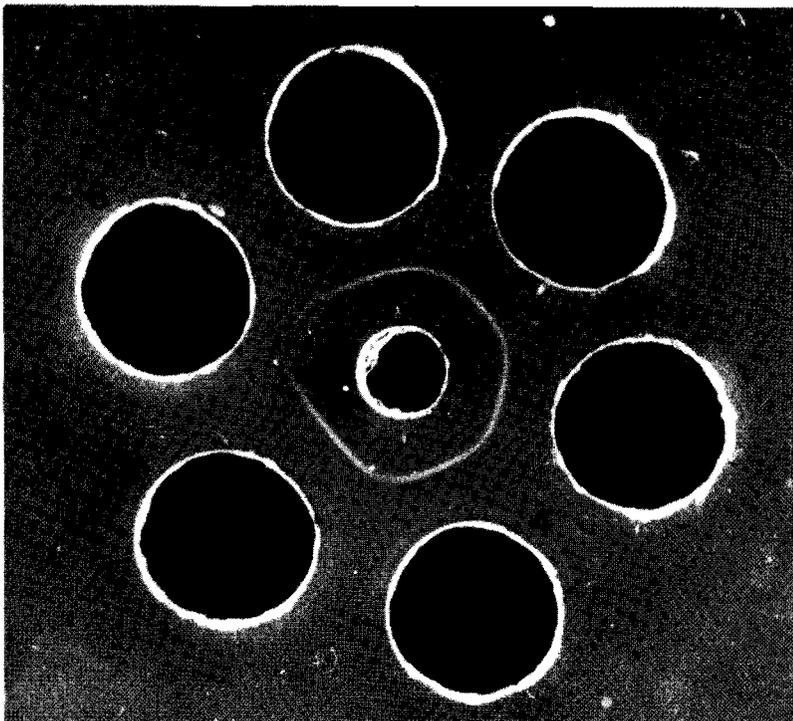


Fig. 1.— Prueba de Duchterlony para investigar la identidad de las bandas de precipitación. Los hoyos 1 y 2 corresponden a muestras de líquido amniótico. El hoyo 3 corresponde a suero de cordón umbilical. Los hoyos 4 y 5 corresponden a sueros de pacientes con hepatoma. El hoyo 6 corresponde a solución salina.

La inmunodifusión se realizó siguiendo las modificaciones que hicieron Hernández y cols (41, 42), utilizando láminas portaobjetos de vidrio cubiertas con 3 ml de agarosa al 1,25% en amortiguador barbital 0,1 M, pH 8,6. La muestra problema se colocó en 3 hoyos con capacidad de 5,30 y 50 μ l, y a 3 mm de separación de cada una de ellas se colocó el antisuero en un hoyo con capacidad para 5 μ l (Fig. 2). Luego las láminas fueron incubadas en cámara húmeda a temperatura ambiente, observándose posteriormente la presencia o no de bandas de precipitación, las cuales pueden aparecer a partir de las 6 horas, hasta las 24 y 48 horas.

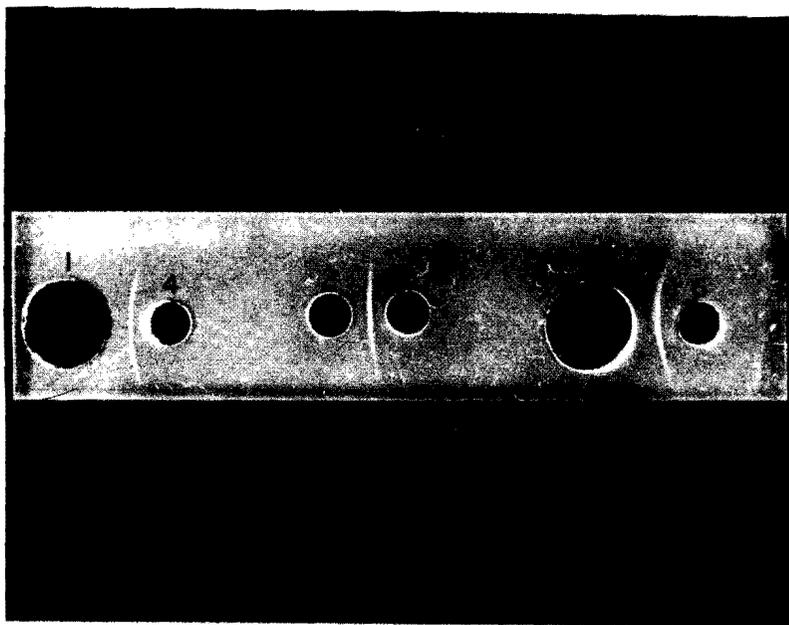


Fig. 2.— Prueba de inmunodifusión simple modificada por Hernández y cols. Los hoyos 1, 2 y 3 corresponden a muestras de líquido amniótico en cantidades de 30,5 y 50 μ l respectivamente. Los hoyos 4,5 y 6 corresponden a 5 μ l de antisuero anti alfa-1-fetoproteína.

La cuantificación de la AFP se hizo por el método de inmunodifusión radial, empleando placas M "Partigen" (Behringwerke, A.G. K-Batch N° 0605) (Fig. 3). Por este método la concentración de AFP en el líquido amniótico es comparado con soluciones estándar de concentraciones conocidas y los resultados son expresados en mgr/100 ml.

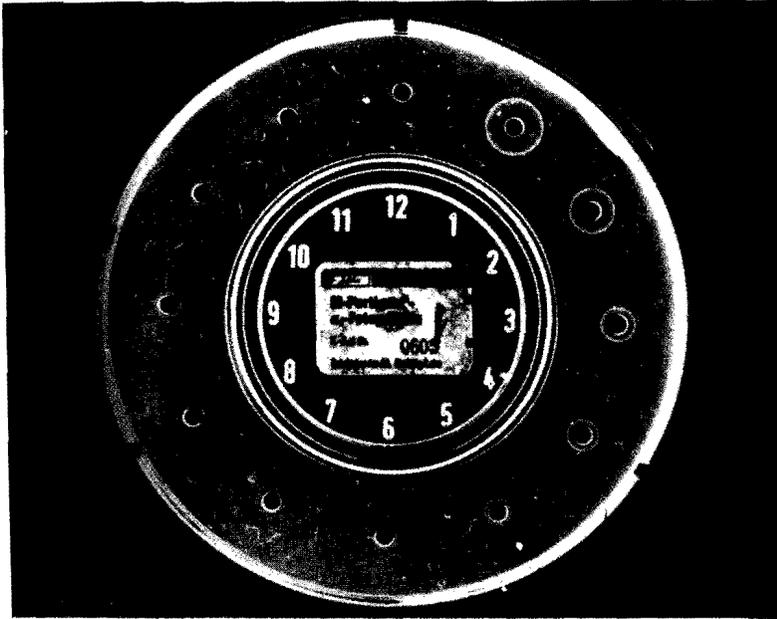


Fig. 3.— Pruebas de inmunodifusión radial. Los hoyos 1,2 y 3 corresponden al estándar de alfa 1-fetoproteína a diferentes diluciones. Los hoyos restantes corresponden a halos de precipitación que dieron las muestras de líquido amniótico estudiadas.

RESULTADOS

La agrupación de las muestras estudiadas de acuerdo a los antecedentes obstétricos de la madre, se presenta en la tabla I; en ella se muestra el número de casos por cada grupo y el porcentaje de los mismos. Como puede observarse el grupo más numeroso correspondió al de embarazos normales.

Por ser muy grande el número de muestras procesadas, por proceder de embarazos a diferentes edades de gestación, y por dificultarse en consecuencia el análisis de distribución, decidimos agruparlas por grupos de edad gestacional, según se muestra en la tabla II. En la misma se observa el número de muestras estudiadas por grupos de edad gestacional y el porcentaje de las mismas, observándose que el número de muestras aumentó en relación directa con la edad gestacional, encontrándose el mayor número de casos en los grupos de 36-39 semanas y en el de 40-43, es decir en los grupos que corresponden a un embarazo a término.

TABLA II**MUESTRAS DE LIQUIDO AMNIOTICO SEGUN EDAD
DE GESTACION**

Semanas de gestación	Número de muestras	Porcentaje
16-19	1	0,66
20-23	7	4,66
24-27	6	4,00
28-31	12	8,00
32-35	18	12,00
36-39	80	53,34
40-43	26	17,34
TOTAL	150	100,00

En la tabla III se presentan el número de muestras positivas encontradas por edad gestacional y su porcentaje; como vemos, el mayor número y por tanto el mayor porcentaje se observó en los grupos de 16-19, 24-27 y 36-39 semanas de gestación.

TABLA III**ALFA-FETOPROTEINA EN LIQUIDO AMNIOTICO
SEGUN EDAD DE GESTACION**

Semanas de gestación	Número de muestras	Pruebas positivas	Porcentaje positivas
16-19	1	1	100,0
20-23	7	4	57,14
24-27	6	1	16,66
28-31	12	—	—
32-35	18	—	—
36-39	80	1	1,25
40-43	26	—	—
TOTAL	150	7	4,66

En la tabla IV observamos el número de muestras positivas que no se acompañaron de malformación y el número de éstas que sí se acompañaron de alguna malformación. Como vemos el mayor número de muestras positivas se encontraron a las 20-23 semanas de gestación; en los grupos de 16-19, 24-27 y 36-39, se observó un solo caso de positividad de la prueba en cada uno de ellos. De estos hallazgos podemos deducir que la prueba es mayormente positiva en edades tempranas del embarazo.

TABLA IV

**POSITIVIDAD DE ALFA-FETOPROTEINA EN LIQUIDO AMNIOTICO
SEGUN EDAD DE GESTACION, CON O SIN MALFORMACION**

Semanas de gestación	Pruebas positivas				Total
	Con malformación		Sin malformación		
	Nº de casos	%	Nº de casos	%	
16-19	—	—	1	20	1
20-23	1	50	3	60	4
24-27	1	50	—	—	1
28-31	—	—	—	—	—
32-35	—	—	—	—	—
36-39	—	—	1	20	—
40-43	—	—	—	—	—
TOTAL	2	100	5	100	7

En la figura 4, se presentan los valores en mgr/100 ml de alfa 1-fetoproteína en 68 muestras estudiadas. Como se puede observar, solamente aquellos líquidos con más de 1,1 mgr/100 ml de esta proteína dieron halos de precipitación en la inmunodifusión radial (Fig. 3). Además, se observa que la mayoría de las muestras cuantificadas están por debajo de 1 mgr/100 ml, incluyendo uno de los dos casos de anencefalia encontrados.

DISCUSION

La presencia de AFP en el suero de pacientes con hepatomas (3, 7, 9-11, 15, 17, 27, 42, 44, 47, 54, 56, 83) y otras enfermedades hepáticas no neoplásicas (26, 41, 42, 45, 82), es un hecho ya demostrado. En la actualidad no

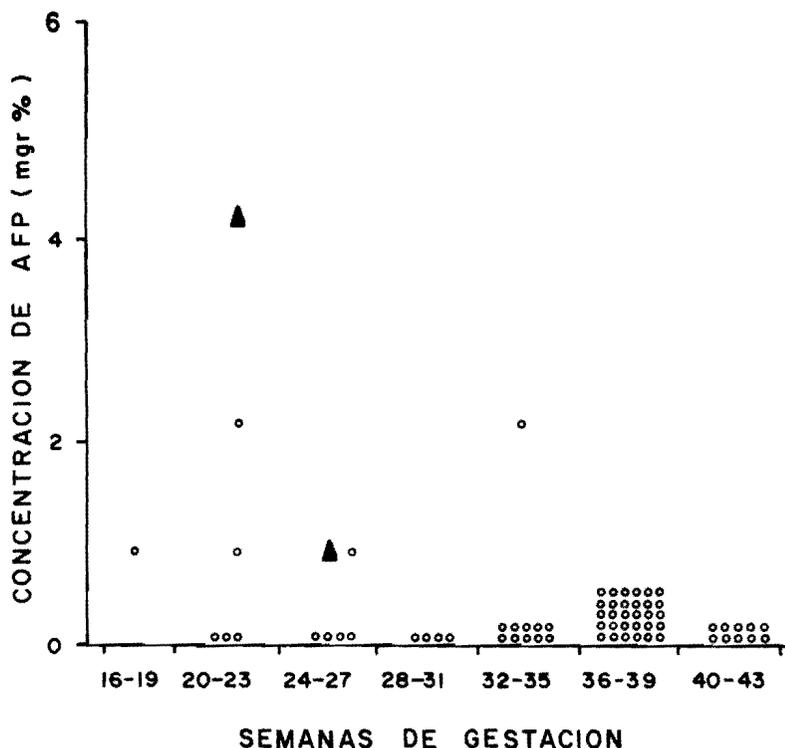


Fig. 4.— Concentración (mgr%) de alfa 1-fetoproteína en muestras de líquido amniótico. ▲ -Anencefalia. ○ -Normales.

hay un mecanismo que explique satisfactoriamente su presencia en el suero de adultos y niños mayores de 10 meses con padecimientos hepáticos. En los casos de hepatomas, se ha propuesto la hipótesis de un probable mecanismo de de-depresión genética (30) relacionado directamente con el estado embrionario del tejido hepático.

Recientemente han aparecido numerosos trabajos que informan la presencia de estas proteínas en el líquido amniótico en casos de ciertas malformaciones del sistema nervioso central: anencefalia, hidrocefalia, espina bífida, síndrome nefrótico congénito, onfalocele, etc (4, 18-21, 23-25, 37, 40, 46, 48-50, 55, 60, 72-74, 76, 77, 80, 86-88). En estos casos no podemos suponer un mecanismo similar al que se observa en las neoplasias que derivan primariamente del tejido hepático.

Se dice que en el caso de defecto del tubo neural abierto, la presencia de AFP en el líquido amniótico es debida a la transferencia de la proteína del líquido cefalorraquídeo y que quizás por esta razón esta proteína no está presente en casos de lesiones cerradas. La aparición de títulos elevados

de esta proteína en el suero materno y en líquido amniótico en casos de muerte intrauterina, resultan de la trasudación de esta proteína del feto y a trastornos placentarios; igual mecanismo se ha propuesto para explicar la presencia de títulos elevados de AFP en el suero de madres diabéticas (2).

Sin embargo, pudimos comprobar mediante la técnica de inmunodifusión (49), que la AFP presente en el líquido amniótico es similar a la del suero obtenido de cordón umbilical de recién nacidos, y a la presente en el suero de pacientes con hepatomas (Fig. 1).

En un comienzo el objeto de nuestro trabajo fué solamente el buscar o detectar la presencia de AFP en líquido amniótico y ver que relación guardaba ésta con la aparición de alguna malformación en el producto de ese embarazo; pero dado que con la prueba cualitativa de inmunodifusión encontramos un 4, 66% de positividad y a que solamente en dos de ellos (1,33%), se pudo comprobar la presencia de una malformación (anencefalia), mientras que en el grupo restante (3,33%), los productos fueron aparentemente normales en el momento del nacimiento, decidimos cuantificar esta proteína en todos los casos positivos y en 61 muestras negativas, tomadas al azar, utilizando la técnica de inmunodifusión radial.

En 5 de los casos positivos (3,33%), la muestra de líquido amniótico fue obtenida con sangre y la positividad de la prueba la explicamos por esta razón; pensamos que la sangre contaminante era fetal, ya que muestras posteriores de algunas de estas pacientes fueron negativas.

En uno de estos casos, dado que había antecedentes familiares de Síndrome de Down y la paciente tenía 42 años, ella decidió practicarse el aborto, aferrándose a la positividad de la AFP que se le había reportado; el feto fué examinado por el anatomopatólogo quien informó que éste era completamente normal. La cuantificación de la AFP en este caso cayó dentro de nuestro rango normal. Este caso es similar al observado recientemente por Campbell y cols (22), quienes reportaron un caso con marcada elevación de los niveles de AFP en el líquido amniótico a las 17 1/2 semanas de gestación, y una vez practicado el aborto se comprobó que el producto era un feto normal. La muestra de líquido amniótico en este caso, al igual que en el nuestro, fué reportado como contaminado con sangre y ésta es la explicación; por lo que se sugiere que dadas estas evidencias se hace necesario demarcar claramente la línea divisoria entre niveles normales y patológicos.

Cuando cuantificamos estas 5 muestras positivas, pudimos comprobar que los valores de AFP eran iguales a nuestro grupo testigo, por lo que concluimos que posiblemente la positividad era debida a contaminación con sangre fetal.

Estos hallazgos son similares a los encontrados por otros autores (85), quienes han sugerido que esta positividad es debida a una transfusión fetomaterna significativa, por lo que ellos aconsejan que en todos estos casos, en las muestras de líquido amniótico debe investigarse la presencia de eritrocitos fetales. Estos mismos autores refieren que un solo mililitro de sangre fetal es capaz de producir cantidades alarmantes de AFP en líquido amniótico a las 14 semanas y que esta cantidad disminuirá si ésta se mezcla completamente con el líquido amniótico; por lo que ellos sugieren que en todos aquellos casos positivos debe tomarse nueva muestra para repetir la prueba y si aún continúa positiva, se debe ayudar en el diagnóstico definitivo con la sonografía y la amniografía, antes de tomar una decisión electiva de interrupción del embarazo. Esta fué la conducta asumida en nuestros dos casos de anencefalia.

Sin embargo hay otros autores (55), quienes afirman que la presencia de sangre en el líquido amniótico no tiene influencia significativa en la aparición de AFP en el mismo.

En dos casos de los estudiados, donde debido a que la positividad de la prueba aparecía muy tempranamente (6 horas de incubación), alertamos al obstetra, quien indicó sonografía y amniografía, demostrándose con estas últimas, la presencia de anencefalia; por lo que se decidió interrumpir el embarazo. Esto confirma aún más lo observado por Harris y cols. (40) quienes en estudio retrospectivo de madres de alto riesgo, concluyeron que, cuando la determinación de AFP, amniografía y ultrasonografía son empleadas para detectar anencefalia y espina bífida, muchos casos pueden ser detectados antes de las 20 semanas de gestación, aún cuando ellos encontraron que algunos casos de defectos de tubo neural cerrados y en un caso de espina bífida abierta a las 33 semanas de gestación, estuvieron asociados con niveles normales de AFP.

Cuando cuantificamos estos dos casos de anencefalia, pudimos observar que en uno de ellos los niveles de AFP eran elevados (4,95 mgr/100 ml), lo cual coincide con lo observado por otros autores (4, 18-21, 23, 25, 37, 40, 46, 48-50, 55, 60, 72, 73, 74, 76, 77, 80); mientras que en el otro caso los niveles de AFP cayeron dentro del rango de los normales, es decir, por debajo de 2,5 mgr/100 ml (1,1 mgr/100 ml). Nuestro hallazgo ha sido observado por otros autores quienes han utilizado técnicas más sensibles que la inmunodifusión radial, y así vemos que Weiss y cols. (87), utilizando la electro-

inmunodifusión, encontraron que en dos casos de anencefalia, uno de espina bífida y uno de hidrocefalia, los niveles de AFP en el líquido amniótico fueron normales después de las 26 semanas de gestación (edad ésta igual a la de nuestro caso). Milunsky (55), estudió un caso de anencefalia a las 36 semanas de gestación y en el mismo no pudo detectar la AFP por electroinmunodifusión, por lo que afirma que cerca de un 85-90% de fetos afectados de malformaciones del SNC, pueden probablemente ser diagnosticados "in útero" hoy día, sobre todo si la presencia de esta proteína se determina en mujeres con embarazos de alto riesgo y si se ayuda en el diagnóstico definitivo con otras pruebas; ya que esta prueba es de mucha ayuda en el diagnóstico pre-natal de estos defectos lo que representa un avance en la detección temprana de los mismos.

Laurence y cols. (49) describieron el caso de un feto con un gran encefalocele occipital, cuyos niveles de AFP a las 16 y 34 semanas de gestación fueron normales, por lo que sugieren que la determinación de AFP no tiene valor cuando la lesión encontrada es cerrada, y concluyen que niños o fetos seriamente afectados pueden ocasionalmente escapar a la detección pre-natal.

En los tres casos de isoimmunización estudiados, pudimos comprobar que la AFP fué negativa en todos ellos, a pesar de que hay autores (78) que han reportado elevación de los niveles de esta proteína en el líquido amniótico.

En todos los casos donde había antecedentes de malformaciones del SNC, también fué negativa la prueba.

Los dos casos de malformación comprobada pertenecían al grupo III es decir, pertenecían al grupo donde no había ningún antecedente obstétrico ni de isoimmunización.

Recientemente se han descrito pruebas inmunológicas para detectar proteínas del LCR en el líquido amniótico, las cuales parecen ser más específicas como ayuda diagnóstica en casos de defectos del tubo neural y se basan en el principio de la presencia de LCR en el líquido amniótico (51, 87).

Los productos de degradación de fibrina y fibrinógeno también han sido reportados aumentados en líquido amniótico en casos de defectos del tubo neural (52), y quizás también el uso de este método para el diagnóstico de estas malformaciones sea de gran ayuda.

De las siete muestras de líquido amniótico positivas y cuantificadas, solamente una de ellas dió valores elevados, muy por encima de los valores

encontrados en nuestro rango normal, y ésta correspondió a uno de los casos de anencefalia estudiados.

La prueba cuantitativa utilizada no aumentó lógicamente el número de muestras que inicialmente fueron positivas por inmunodifusión simple, sino por el contrario, ésta mostró una sensibilidad menor.

El hecho de que no la pudiéramos detectar en el líquido amniótico del resto del grupo estudiado, no nos inclina a pensar que en estos no existían malformaciones en los productos de esos embarazos, quizás las hubo y el obstetra no las pudo observar en el momento del parto y por lo tanto no nos fué referida en la historia; aunado ésto a que este tipo de paciente es difícil de localizar una vez dado de alta, por lo que no nos fué posible constatar la presencia o no de algún tipo de malformación en esos niños.

Nosotros consideramos que el método cualitativo que utilizamos en este trabajo nos permitió detectar esta proteína aún en casos donde las cantidades de ella estaban por debajo de 1 mgr/100 ml, ya que la modificación de la técnica de inmunodifusión empleada por Hernández y cols. (41, 42) ha demostrado que al variar las proporciones de combinación entre antígeno y anticuerpo, hay mayores posibilidades de detectar bandas de precipitación.

Por otro lado, para poderle dar un valor diagnóstico a la prueba, hay que tener muy en cuenta la sensibilidad de la prueba utilizada, ya que de acuerdo al método empleado, la cantidad de AFP varía grandemente. El método cualitativo empleado por nosotros no es el más sensible, puesto que solo mide concentraciones por encima de 2,5 mgr/100 ml (2), pero a pesar de ésto nos fué de mucha ayuda en nuestro estudio, ya que con él pudimos demostrar lo que ya otros autores habían encontrado.

Por estas razones es deseable utilizar el radioinmunoanálisis (2, 6, 66, 69), ya que hasta el momento ha demostrado poseer la mayor sensibilidad (2,5 mgr/ml); a pesar de que se ha dudado de los resultados obtenidos por estas técnicas, debido a que las proteínas utilizadas como antígenos requieren un grado absoluto de pureza, puesto que de otra manera cualquier contaminación puede dar lugar a falsos positivos en los límites más bajos de la concentración del antígeno investigado.

ABSTRACT

Alpha 1-fetoprotein in antenatal diagnosis of congenital malformations.

Villalobos-Roldán A. (Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela), Angarita I., González-Govea

F. Invest Clín 19(1): 2-23, 1978. Presence of alpha 1-fetoprotein (AFP) was studied in 150 samples of amniotic fluid taken by trans-abdominal amniocenteses in pregnant women between 16 and 43 weeks of gestation, in order to determine if there was any relation between its presence and congenital malformations. The immunodiffusion method, modified by Hernandez y cols. was used. Quantification was done by radial diffusion. Results showed that if a specimen is contaminated with fetal blood, AFP could be present without malformation. Also some CNS malformations, as anencephaly, can be carried through with normal levels of AFP in amniotic fluid. Every immunization case studied did have normal levels of AFP. We concluded that every high risk pregnant women should be tested for AFP in amniotic fluid, being sure the sample is not contaminated with blood. Every positive case should be tested again, and if is still positive, amniography and sonography must be done. Interruption of the pregnancy should be offered as an option.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ADINOLFI A, ADINOLFI M, COHEN S: Isolation and characterization of human foetal α globulin (α 1F) from foetal and hepatoma sera. *Biochem Biophys Acta* 251: 197-207, 1971.
- 2- ADINOLFI A, ADINOLFI M, LESSOF M: Alpha-fetoprotein during development and in disease. *J Med Genet* 12: 138-151, 1975.
- 3- ALEXANDER P: Foetal "Antigens" in cancer. *Nature* 235: 137-140, 1972.
- 4- ALLAN L, FERGUSON-SMITH M, DONALD I, SWEET E, GIBSON A. Amniotic fluid alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of spina bifida. *Lancet* 2: 522-525, 1973.
- 5- ALPERT E, URIEL J, NECHAUD B de: Alpha 1-fetoglobulin in the diagnosis of human hepatoma. *New Eng J Med* 278: 984-986, 1968.
- 6- ALPERT E, HERSBERG R, SCHURR P, ISSELBACHER K: Alpha-fetoprotein in human hepatoma: improved detection in serum and quantitative studies using a new sensitive technique. *Gastroenterology* 61: 137-143, 1971.
- 7- ALPERT E, PINN V, ISSELBACHER K: Alpha-fetoprotein in a patient with gastric carcinoma metastatic to the liver. *New Eng J Med* 285: 1058-1059, 1971.
- 8- ALPERT E, DRYSDAZE J, ISSELBACHER K, et al: Isolation of human alpha-fetoprotein. *J Biol Chem* 247: 3792-3798, 1972.

- 9-- ANDRIEW J, BREART G, RODIER B, ROBERT P: The existence of alpha-fetoprotein without hepatoma. *Press Méd* 79: 1595-1596, 1971.
- 10-- BAGSHAWE A, PARKER A: Age-distribution of α -fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2: 268, 1970.
- 11-- BALLAS M: Yolk sac carcinoma of the ovary with alphafetoprotein in serum and ascitis fluid demonstrated by immunoosmophoresis. *Am J Clin Pathol* 57: 511-516, 1972.
- 12-- BERGSTRAND C, CZAR B: Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest* 8: 174, 1955.
- 13-- BERGSTRAND C, CZAR B: Paper electrophoretic study of human fetal serum proteins with demonstration of a new protein fraction. *Scand J Clin Lab Invest* 9: 277-286, 1957.
- 14-- BERGSTRAND C, KARLSSON B, LINDBERT T, EKELUND H: α -fetoprotein, albumin and total protein in serum from preterm and term infants and small for gestational age infants. *Acta Paed Scand* 61: 128-132, 1972.
- 15-- BERNADES P, SMADDJA M, RUEFF B, BONNEFOND A, TURSZ T, MARTIN E, BOGNEL C, BARGE J, URIEL J: Presence of α -1-fetoprotein in the serum of 4 cases of primary digestive carcinoma other than hepatoma. *Presse Méd* 79: 1585-1589, 1971.
- 16-- BODMAN J: Development of foetal proteins. *Clin Chim Acta* 4: 103-109, 1959.
- 17-- BOURGEAUX I, MARTIN F, CABANNE F, AUPEEL P, GUERRIN J: Practical value of α 1-fetoprotein in the diagnosis post-operative surveillance of embryonic tumours of the testes. *Press Méd* 79: 1589-1590, 1971.
- 18-- BROCK D, SUTCLIFFE R: Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet* 2: 197-199, 1972.
- 19-- BROCK D, SCRIMGEOUS J: Early prenatal diagnosis of anencephaly. *Lancet* 2: 1252-1253, 1972.
- 20-- BROCK D, BOLTON A, MONAGHAN J: Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum-alpha fetoprotein measurement. *Lancet* 2: 923-924, 1973.
- 21-- BROCK D, SCRIMGEOUS J: Alpha-fetoprotein diagnosis of CNS malformations. *Lancet* 1: 569, 1974.

- 22-- CAMPBELL S, PRYSE-DAVIS J, COLTART T, et al: Ultrasound in the diagnosis of spina bifida. *Lancet* 1: 1065-1067, 1975.
- 23-- CARTER C, ROBERTS J: The risk of recurrence after two children with central-nervous-system malformations. *Lancet* 1: 306, 1967.
- 24-- DE BRUIJN H, HUISJES H: Onphalocele and raised alpha-fetoprotein in amniotic-fluid. *Lancet* 1: 525-526, 1975.
- 25-- FIELD B, MITCHELL G, GARRET W, KERR C: Amniotic alpha-fetoprotein levels and anencephaly. *Lancet* 2: 798, 1973.
- 26-- FLORIN A, ARANA M: Alpha 1-fetoprotein and antialpha-fetoprotein in acute viral hepatitis. *Brit Med J* 2: 94-95, 1973.
- 27-- FOLI A, SHERLOK S, ADINOLFI M: Serum α 1-fetoprotein in patients with liver disease. *Lancet* 2: 1267-1269, 1969.
- 28-- FOY H, KONDI A, LINSELL C: Fetoprotein in pregnant african women. *Lancet* 2: 663-664, 1970.
- 29-- FOY H, KONDI A, PARKER A, STANLEY R, VENNING C: The alpha-fetoprotein in pregnant women, women on oral contraceptives, newborn babies and pyrodixone-deprived baboons. *Lancet* 1: 1336-1337, 1970.
- 30-- FRENSTER J, HERLEN P: Gene de-repressions. *New Engl J Med* 283: 1244-2229, 1973.
- 31-- GAJDOS A: α alpha foetoproteine. *Nouv Presse Med* 15: 987-991, 1973.
- 32-- GALDO A, CASADO J, TALAVERA R: Demonstration dans le sérum du foetus humain d'une nouvelle fraction protéique au moyen de l'electrophorèse sur papier. *Arch Franc Pédiat* 16: 954-962, 1959.
- 33-- GITLIN D, BOESMAN M: Serum alpha-fetoprotein albumin and gamma G-globulin in the human conceptus. *J Clin Invest* 45: 1826-1838, 1966.
- 34-- GITLIN D, BOESMAN M: Sites of serum alpha-fetoprotein synthesis in the human and in the rat. *J Clin Invest* 46: 1010-1016, 1967.
- 35-- GITLIN D: Site of alpha-fetoprotein synthesis. *New Eng J Med* 285: 1436-1437, 1971.
- 36-- GITLIN D, PERRICELLI A, GITLIN G: Syntesis of α -fetoprotein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer Res* 32: 979-982, 1972.

- 37- GRABAR P, WILLIMS C: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochem Biophys Acta* 10: 193, 1953.
- 38- HALBRECHT I, KLIBANSKI C, BRZOZA H, LAHAV M: Further studies on the various hemoglobins and the serum protein fractions in early embryonic life. *Amer J Clin Path* 29: 340-344, 1958.
- 39- HALBRECHT I: Clinical significance of the fetal and embryonic hemoglobins and of the embryonic serum protein fraction. *Harefuah* 57: 267, 1959.
- 40- HARRIS R, JENNISON R, BARSON A, LAURENCE K, ROUSLAHTI E, SEPPALA M: Comparison of amniotic-fluid and maternal serum-alpha-fetoprotein levels in the early antenatal diagnosis of spina bifida and anencephalic. *Lancet* 1: 429-433, 1973.
- 41- HERNANDEZ M, ZAPATA R, GUTIERREZ G, KUMATE J: Determinación de alfa 1-fetoproteína en el curso de niños con amibiasis invasora. En: *Memorias del V Simposium sobre amibiasis*. México, Febrero, 1974.
- 42- HERNANDEZ M, ROLDAN A de, RODRIGUEZ F, GARCIA F, KUMATE J: Alfa 1-fetoproteína en el suero de niños con hepatitis viral. En: *Memorias de las Jornadas Nacionales de Microbiología*. Mérida, Venezuela, 1976, p. 8.
- 43- HERST T, HOLLINGER B, GOYAL R, GRUBB M, MELNICH J: Australia antigen and antibody and alpha-fetoglobulin hepatoma patients. *Int J Canc* 8: 259-261, 1971.
- 44- HOUSTEK J, MASOPUST J, KITHIER K, JIRI R: Hepatocellular carcinoma in association with a specific fetal globulin fetoprotein. *J Pediat* 72: 186-193, 1968.
- 45- KARVOUNTZIS G, REDEKER A: Relation of alpha-fetoprotein in acute hepatitis to severity and prognosis. *Ann Int Med* 80: 156-160, 1974.
- 46- KJESSLER B, JOHANSSON A, SHERMAN M, GUSTAVSON K: Alpha-fetoprotein in antenatal congenital nephrosis. *Lancet* 22: 432-433, 1975.
- 47- KOZOWER M, FAWAZ K, MILLER H, KAPLAN M: Positive alpha-fetoglobulin in a case of gastric carcinoma. *New Eng J Med* 285: 1059-1060, 1971.
- 48- LAURENCE K, TEW B: Natural history of spina bifida cystica and cranium bifidum cysticum. *Arch Dis Child* 46: 127-138, 1971.

- 49-- LAURENCE K, TURNBULL A, HARRIS R, JENNISON R, ROUSLAHTI E, SEPPALA M: Antenatal diagnosis of spina bifida. *Lancet* 2: 860, 1973.
- 50-- LORBER J, STEWARD C, WARD A: Alpha-fetoprotein in antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet* 1: 1187, 1973.
- 51-- MACRI J, WEISS R, JOSHI M: Antenatal diagnosis of neural tube defects using cerebrospinal fluid protein. *Lancet* 1: 14-15, 1974.
- 52-- MACRI J, WEISS R, JOSHI M: β -trace protein and neural tube defects. *Lancet* 1: 1109-1010, 1974.
- 53-- MASOPUST J, KOTAL L: Fetoprotein: Immunochemical behaviour of an autonomous fetal component in sera from human fetuses. *Ann Paediat (Basel)* 204: 138-140, 1965.
- 54-- MEHLMAN D, BULKLEY B, WIERNIK P: Serum alpha₁-fetoglobulin with gastric and prostatic carcinomas. *New Eng J Med* 285: 1060-1061, 1971.
- 55-- MILUNSKI A, ALPERT E: The value of alpha-fetoprotein in the prenatal diagnosis of neural tube defects. *J Pediat* 84: 889-893, 1974.
- 56-- MUÑOZ J, FUILLEN G, TORIBIO F: Alpha₁-fetoprotein in hepatomas, neoplasma, and other illnesses. *Lancet* 1: 850-851, 1972.
- 57-- MURALT G, ROULETH: Etude immunologique des proteines seriques fortes humaines. *Helv Paediat Acta* 15: 517-533, 1961.
- 58-- MURGITA R, TOMASI T: Suppression of the immune response by α -fetoprotein. I- The effect of mouse α -fetoprotein on the primary and secondary antibodies response. *J Exp Med* 141: 269-286, 1975.
- 59-- MURGITA R, TOMASI T: Suppression of the immune response by α -fetoprotein. II- The effect of mouse α -fetoprotein on mixed lymphocyte reactivity and mitogen-induced lymphocyte transformation. *J Exp Med* 141: 440-452, 1975.
- 60-- NEVIN N, NESBITT S, THOMPSON W: Myelocoele and alpha-fetoprotein in amniotic fluid. *Lancet* 1: 1383, 1973.
- 61-- NISHI S: Isolation and characterization of a human fetal α -globulin from the sera of fetuses and hepatoma patient. *Cancer Res* 30: 2507-2513, 1972.
- 62-- O'CONNOR G, TATARINOV Y, ABELEV G, URIEL J: A collaborative study for the evaluation of a serologic test for primary liver cancer. *Cancer* 25: 1091-1098, 1970.

- 63-- OUCHTERLONY O: Antigen-antibody reactions in gel. *Acta Phatol Microbiol Scand* 26: 507-515, 1949.
- 64-- PEDERSEN K: Fetuin a new globulin isolated from serum. *Nature* 154: 575, 1944.
- 65-- PUDIE D, HOWIE P, EDGAR W, et al: Raised amniotic fluid FDP in fetal neural tube anomalies. *Lancet* 1: 1013, 1975.
- 66-- PURVES L, GEDDES E: A more sensitive test for alpha-fetoprotein. *Lancet* 1: 47, 1972.
- 67-- PURVES L, BRANCH W, BOES E: Alpha-fetoprotein as a diagnostic aid. *Lancet* 1: 1007, 1973.
- 68-- ROUSLAHTI E, SEPPALA M: Studies of carcino-fetal proteins. Physical and chemical properties of human alpha-fetoproteins. *Int J Cancer* 8: 218-225, 1971.
- 69-- ROUSLAHTI E, SEPPALA M: Studies of carcinofetal protein. III- Development of a radio immunoassay for alpha-fetoprotein in serum of healthy human adults. *J Cancer* 8: 374-383, 1971.
- 70-- ROUSLAHTI E, SEPPALA M: Alpha-fetoprotein in normal human serum. *Nature* 235: 161-162, 1972.
- 71-- SCHEIDEGGER J: Une micro-méthode de l'immuno-electrophorèse. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 7: 103-110, 1955.
- 72-- SELLER M, CAMPBELL S, COLTART T, SINGER J: Early termination of anencephalic pregnancy after detection by raised alpha fetoprotein levels. *Lancet* 2: 73, 1973.
- 73-- SELLER M, SINGER J, COLTART T, CAMPBELL S: Maternal serum alpha-fetoprotein levels and prenatal diagnosis of neural-tube defects. *Lancet* 1: 428-429, 1974.
- 74-- SEPPALA M, ROUSLAHTI E: Alpha-fetoprotein in amniotic fluid. An index of gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 114: 595-598, 1972.
- 75-- SEPPALA M: Alpha-fetoprotein in women taking oral contraceptives. *Int J Fert* 18: 206-208, 1973.
- 76-- SEPPALA M: Increased alpha-fetoprotein in amniotic fluid associated with congenital esophageal atresia. *Obstet Gynecol* 42: 613-624, 1973.

- 77- SEPPALA M, ROUSLAHTI E: Alpha-fetoprotein in maternal serum. A new marker for detection of fetal distress and intrauterine death. *Am J Obstet Gynecol* 115: 48-52, 1973.
 - 78- SEPPALA M, ROUSLAHTI E: Alpha-fetoprotein: Physiology and pathology during pregnancy and application to antenatal diagnosis. *J Perinat Med* 1: 104-113, 1973.
 - 79- SEPPALA M, ROUSLAHTI E: Alpha-fetoprotein in antenatal diagnosis. *Lancet* 1: 155, 1973.
 - 80- SEPPALA M, UNNERUS H: Elevated amniotic fluid α -fetoprotein in fetal hydrocephaly. *Am J Obstet Gynecol* 119: 270-272, 1974.
 - 81- SIMONS M, HOSKING C: AFP and ataxia-telangiectasia. *Lancet* 1: 1234, 1974.
 - 82- SMITH J: Occurrence of alpha-fetoprotein in acute viral hepatitis. *Int J Canc* 8: 421-424, 1971.
 - 83- STILLMAN A, ZAMCHECK H: Recent advances in immunologic diagnosis of digestive tract cancer. *Amer J Dig Dis* 15: 1003, 1970.
 - 84- WALDMANN T, McINTIRE K: Serum alpha-fetoprotein levels in patient with ataxia-telangiectasia. *Lancet* 2: 1112-1115, 1972.
 - 85- WARD A, STEWARD C: False positive results in antenatal diagnosis of neural-tube disorders. *Lancet* 2: 345-346, 1974.
 - 86- WEINBERG A, MILUNSKY A, HARROD M: Elevated amniotic-fluid alpha-fetoprotein and duodenal atresia. *Lancet* 13: 496, 1975.
 - 87- WEISS R, JAMES G, MACRI N, ELLIGERS K, PRINCLER G, McINTIRE R, WALDMAN T: Amniotic fluid α -fetoprotein as a marker in prenatal diagnosis of neural tube defects. *Obstet Gynecol* 47: 148-150, 1976.
 - 88- WILLIAMS C, GRABAR P: Immuno-electrophoretic studies on serum proteins. I- The antigens of human serum. *J Immunol* 74: 158-160, 1955.
-