

Concentraciones séricas de factor de necrosis tumoral-alfa en el embarazo normal

Drs. Rafael Molina Vilchez*, Tania Romero Adrián**, Ana Ruiz***, Evelyn González***, Jesús Estévez****, Ricardo Atencio****

RESUMEN

Objetivo: Investigar las concentraciones séricas del factor de necrosis tumoral-alfa durante el embarazo normal.

Método: Estudio prospectivo de 90 gestantes normales (30 de cada trimestre), sin trabajo de parto y un grupo de 30 controles no gestantes. La citocina se midió por un método de análisis enzimático (ELISA) de doble anticuerpo.

Ambiente: Cátedra de Inmunología Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

Resultados: Primer trimestre: $14,9 \pm 1,3$ pg/ml. Segundo trimestre: $35,8 \pm 1,7$ pg/ml. Tercer trimestre: $15,9 \pm 0,5$ pg/ml. Control $30,7 \pm 1,9$ pg/ml.

Conclusiones: Valores significativamente inferiores al control en primer y tercer trimestre, sin cambios durante el segundo. La importante disminución inicial contribuye a la implantación trofoblástica y tolerancia al aloinjerto fetal. El ascenso en segundo trimestre podría relacionarse con la función de factor de crecimiento que tiene este polipéptido. La otra caída significativa, en el tercero, evita el desencadenamiento del parto prematuro.

Palabras clave: Citocinas. Embarazo normal. Factor de necrosis tumoral-alfa.

SUMMARY

Objective: To measure tumor necrosis factor-alpha serum concentrations throughout normal pregnancy.

Method: Prospective study comparing 90 normal pregnant women (30 for each trimester) with a control nonpregnant group. Serum tumor necrosis factor-alpha levels were measured by a double antibody enzymatic immunoanalysis (ELISA).

Setting: Chair of Immunology. Faculty of Medicine. Universidad del Zulia. Maracaibo.

Results: First trimester: 14.9 ± 1.3 pg/ml. Second trimester: 35.8 ± 1.7 pg/ml. Third trimester: 15.9 ± 0.5 pg/ml. Control: 30.7 ± 1.9 pg/ml.

Conclusions: Significant serum concentration lowering in first and third trimester. Non significant variations during the second. The outstanding initial decrease may contribute to the normal trophoblastic implantation and allograft tolerance. A growth-factor effect could explain the second trimester levels. During the third, a new fall is necessary in order to avoid preterm labor.

Key words: Cytokines. Normal pregnancy. Tumor necrosis factor-alpha.

INTRODUCCIÓN

La primera descripción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), corresponde a una proteína encontrada en el suero de animales tratados con endotoxinas de bacterias Gram negativas o lipopolisacáridos (LPS), después de su preparación con bacilos de Calmette y Guérin, capaz de producir,

in vivo, necrosis hemorrágica de los tumores e *in vitro*, efectos citostáticos y citocidas sobre las células tumorales (1). El TNF- α es un mediador soluble de la inmunidad celular, un homotrímero de 50 kD (2), elaborado por macrófagos, células T, B, "asesinas" naturales -NK-, fibroblastos, células endoteliales

Este trabajo ha sido subvencionado por el CONDES Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 08-04-99

Aceptado para publicación: 09-08-99

*Departamento de Obstetricia y Ginecología; Hospital Manuel Noriega Trigo. IVSS, San Francisco, Estado Zulia.

**Directora del Posgrado de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo.

***Cursantes de Posgrado en Inmunología.

****Instituto de Investigaciones Clínicas. Universidad del Zulia.

(3,4), tejidos placentarios y deciduales (5,6), frente a varios estímulos, incluyendo agentes infecciosos. Su principal fuente es el fagocito mononuclear activado por LPS. Es la citocina más importante en la respuesta del organismo hospedero frente a las bacterias Gram- negativas. La reacción de Schartzman, se considera como un modelo experimental para la investigación de los efectos inducidos por los LPS y el TNF- α -, que actúa como mediador obligado de la lesión tisular (3).

La producción de TNF- α - está íntimamente ligada a la de interleucina-1 o IL-1. Ambos polipéptidos son proinflamatorios y muchas de sus funciones biológicas se superponen (1). En la actualidad se piensa que, en cualquier tejido inflamado, se desencadena una secuencia o red de citocinas, que comienza con ellos, los que estimulan la formación de IL-6, mediadora de la fase aguda hepática y facilitadora de reacciones inmunes locales, la cual, a su vez, induce la liberación de IL-8, el factor promotor de la quimiotaxis, que incrementa y prolonga el proceso inflamatorio. Esto se da por igual en la piel con psoriasis, las articulaciones con artritis reumatoide o/y la interfase coriodecidual, donde la IL-1 y el TNF- α - estimulan, tanto al corion como a las células deciduales, para producir IL-8. La gran diferencia con otras localizaciones estriba en que, decidua y corion representan una intercomunicación entre tejidos derivados de dos orígenes completamente distintos: madre y feto (4). Una secuencia de eventos inflamatorios, con producción elevada de estas citocinas, se considera válida como propiciadora del mecanismo de trabajo de parto, tanto de término como pretérmino, por inducción de la secreción de prostaglandinas. El parto se asocia con una liberación elevada de TNF- α -, por células placentarias CD11b-positivas (7).

Entre las funciones más destacadas del TNF- α - está la de estimular un cofactor necesario para la síntesis de óxido nítrico: la tetrahidrobiopterina, que unida a la sintetasa, previamente estimulada por el IFN- γ , lleva a la formación del vasodilatador fisiológico, el cual, además, puede actuar como microbicida y antitumoral (2), así como inhibidor de la agregación plaquetaria (8). Sin embargo, algunos se han referido al TNF- α - como un inhibidor del óxido nítrico (9).

El TNF- α - está ligado a muchas formas de patología, por lo que su estudio se hace atractivo, sobre todo, en obstetricia, en cuanto a posible relación con entidades como la preeclampsia (10).

Es capaz de promover estados de hipercoagulabilidad sanguínea y alterar el metabolismo de las mitocondrias, llevando a aumentar la formación de peróxidos tóxicos. A pesar de que, inicialmente su producción tiende a la protección y al balance de las funciones, puede hacerse mortalmente dañino, como en el síndrome de sepsis (11).

Hemos comenzado a desarrollar una línea de investigaciones sobre citocinas en obstetricia. Antes de penetrar en el campo de la enfermedad, tenemos interés en conocer el comportamiento de estas proteínas reguladoras de la inmunidad en la gestación sin complicaciones. El presente estudio se ocupa de los niveles séricos de TNF- α - en embarazadas normales.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron 90 mujeres gestantes normales, 30 por cada trimestre, y un grupo testigo conformado por 30 no embarazadas, todas con edades comprendidas entre 15 y 35 años. Fueron referidas de diversos centros asistenciales de la ciudad de Maracaibo, eran eumenorreicas, recordaban bien la fecha de la última menstruación, y la edad de gestación calculada con base a ésta, estaba acorde con los datos del examen clínico y la biometría fetal evaluada por ultrasonografía. El grupo del primer trimestre tenía una edad de gestación media (semanas) de 8,0, y error estándar de 0,3, el del segundo, 18,7 \pm 7, y el del tercero, 30,8 \pm 0,6. Las edades maternas (años) tenían media y error estándar de 27,8 \pm 0,4, 25,8 \pm 0,7 y 27,5 \pm 0,5 para los 3 grupos de embarazadas, mientras que el control tenía 27,7 \pm 0,7. A todas se les extrajo 20 ml de sangre venosa, sin usar anticoagulante, separándose el suero por centrifugación a 1 000 g, durante 10 minutos. Esa cantidad se repartió en alícuotas, para análisis de las diversas citocinas, y se guardó a -70°C hasta su examen.

Para medir los niveles de TNF- α - se usó una técnica de inmunoanálisis enzimático (ELISA) de doble anticuerpo, con especificaciones propias de los fabricantes de los equipos: "Quantikine Immunoassays", de los laboratorios "R and D Systems", lote número 9724110. La sensibilidad del método es de 4,4 pg/ml. No ofrece reactividad cruzada o interferencia con otras sustancias. Los valores obtenidos se expresaron en pg/ml, en cifras absolutas, media y error estándar. La comparación de las medias de los distintos grupos, se hizo con la prueba de ANOVA en una dirección, con análisis de Turkey.

RESULTADOS

La media de las concentraciones séricas de TNF- α - en el primer trimestre, expresada en pg/ml, fue de $14,9 \pm 1,3$ pg/ml. En el segundo, fue $35,8 \pm 1,7$ y, en el tercero, $15,9 \pm 0,5$. Las no gestantes tuvieron media de $30,7 \pm 1,9$.

La diferencia de las medias del primero y último trimestre, con la del grupo control, fueron significativamente válidas con $p < 0,001$ para cada comparación. No hubo variaciones de significación en el segundo trimestre.

DISCUSIÓN

La notoria diferencia de las concentraciones de las TNF- α - entre el primer trimestre y los controles, luce ampliamente lógica. Esta citocina inhibe el crecimiento celular y la proliferación de las células trofoblásticas en ratas (5). Para el desarrollo y mantenimiento del embarazo, es necesario el contacto directo del trofoblasto, por expresión del antígeno leucocitario humano- G, o HLA-G (una de las moléculas no clásicas del complejo mayor de histocompatibilidad o MHC), con los linfocitos y macrófagos maternos (12). Las células que expresan HLA-G, modulan a los mononucleares para aumentar la formación de IL-3 e IL-1beta, y hacer descender la de TNF- α - (13). Las citadas interleucinas son estimulantes del crecimiento placentario, mientras que el TNF- α - es proabortivo. La expresión del HLA-G es capaz de inhibir la actividad citolítica de las células NK, por la vía de su receptor inhibitorio (14).

Entre las sustancias inmunosupresoras que tienden a garantizar la sobrevivencia fetal, como estrógenos, progesterona, hidrocortisona, gonadotropina coriónica humana, alfa-fetoproteína, prostaglandina E2 y anexina II, producidas principalmente por el trofoblasto, se encuentran también la espermina y la fetuina. La primera es una amina biógena que se consigue en buenas cantidades en el amnios. La fetuina es una glicoproteína plasmática fetal. Las dos, suprimen la producción de TNF- α -, contribuyendo a la prevención del aborto (15).

En la unión fetoplacentaria de ratas, a las cuales se induce la pérdida fetal por LPS, hay un aumento del contenido de TNF- α -, de la producción de óxido nítrico y de la apoptosis del epitelio y músculo uterino, eventos que pueden ser bloqueados por la IL-10 (16). En el aborto de ratones, tanto espontáneo

como inducido, se consigue un aumento de TNF- α -, IFN- γ , e IL-12, con desencadenamiento de procesos trombóticos e inflamatorios localizados en los vasos deciduales (17-19). El aumento de TNF- α produce igualmente aborto en el humano (7). Es un mediador importante en el rechazo de riñones trasplantados (20), lo que parece compatible con la disminución en primer trimestre, a fin de proteger al feto como aloinjerto.

De acuerdo a lo sugerido por Wegmann y col. (21), muchos aceptan que el embarazo es un fenómeno fisiológico, caracterizado por el predominio de las citocinas producidas por los linfocitos CD4 Th2. No ocurre así en algunos procesos patológicos. Por ejemplo: se ha observado que, en mujeres gestantes afectadas con paludismo, bajan las concentraciones de IL-10, facilitándose la liberación de IFN-gamma, IL-2 y TNF- α -, citocinas de origen CD4 Th1, consideradas negativas para la normal evolución del embarazo. Algunas de las TH 1, como el TNF- α - y la IL-2, se elevan desde el primer trimestre en mujeres gestantes que, posteriormente, sufren de preeclampsia (22). Estos eventos pueden ser desencadenados por la disminución de la expresión de HLA-G en el trofoblasto (23).

En el segundo trimestre hemos encontrado una subida de las concentraciones plasmáticas de TNF- α -, aunque no llegan a sobrepasar significativamente la media del grupo control. A primera vista, parecería paradójico, habida cuenta de todo lo expuesto con anterioridad, la capacidad de este polipéptido de mediar distintas formas de daño multiorgánico, inducir el estrés oxidativo e inhibir al trofoblasto. Contrarrestar un excesivo desarrollo de la placenta, pudiera ser uno de los fines de este ascenso. Las citocinas tienen a veces efectos opuestos, en diferentes localizaciones y condiciones. El TNF- α -, que influye negativamente sobre el trofoblasto, ejerce un efecto de factor de crecimiento sobre otros tejidos (24), tal vez por estímulo al transporte de glucosa dentro de las células (25).

Cuando hay retardo de crecimiento para la edad de gestación, de tipo idiopático, no por causas específicas y bien conocidas, se han conseguido valores bajos de TNF- α -, tanto en sangre materna como fetal (11), lo que parece ligado a relaciones funcionales con otras sustancias. La inyección de anticuerpos anti-TNF- α - a ratones gestantes, ha tenido como consecuencia un severo retardo del desarrollo, con concentraciones bajas de factor de crecimiento insulínico I o IGF-1 (26). Se ha sugerido

que, los valores disminuidos del IGF-1, son importantes en la patogenia del retardo de crecimiento (27).

La caída de los valores séricos en el tercer trimestre, puede relacionarse con otra de las funciones de esta citocina, que tienen, tanto efectos fisiológicos como patológicos. Lo primero es mantener concentraciones bajas, para impedir que se desencadene el trabajo de parto prematuro. Tanto éste, como el de término, se asocian a una producción uterina elevada de citocinas proinflamatorias, como IL-1B, IL-6 y TNF- α (7,28-30). Las dos IL se liberan de las células endoteliales placentarias, mientras que el TNF- α , procede de los macrófagos (7). Es bueno aclarar que en nuestras muestras de tercer trimestre no se incluyó ninguna paciente en trabajo de parto. En cuanto a lo patológico, una elevación progresiva del TNF- α , generaría riesgos de diversos procesos. Citemos sólo como ejemplo el déficit de la beta-oxidación grasa en el hígado, el estrés oxidativo y la formación excesiva de radicales libres, que se consideran, elementos de importancia en la cadena patogenética de la preeclampsia (10), especialmente de su histopatología hepática que, según algunos, forma parte de las llamadas enfermedades grasas microvesiculares (31).

Comparar nuestros resultados con los de otros estudios, tendría valor muy relativo. Generalmente, se consiguen protocolos de trabajo con métodos diferentes. Kupfermanc y col. (32), por ejemplo, estudiaron un grupo control de gestantes nulíparas, sanas y sin trabajo de parto, pero con edad de gestación de $34,6 \pm 4,4$ semanas. En el presente estudio hemos cuantificado la citocina en suero y, su vida media en la circulación es de pocos minutos (32). Otras investigaciones están hechas con sobrenadantes de cultivos celulares. El TNF- α , además, puede unirse a su receptor soluble, a la fibronectina soluble o a la unida con la matriz extracelular (33), modificando sus niveles bioactivos.

Nuestros primeros resultados, deben ser complementados por otras técnicas, como las que emplean sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica, las que miden las concentraciones de los receptores solubles: TNF- α - R α I y II, o de la misma citocina en los tejidos de la interfase materno-fetal.

REFERENCIAS

1. Le J, Vilcek J. Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin-1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987;56(3):234-248.
2. Feldmann M. Colaboración celular en la respuesta de anticuerpos. En: Roitt I, Brostoff J, Male D, editores. *Inmunología*. 4ª edición. Madrid: Harcourt Brace; 1997;8(1):8-16.
3. Abbass AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. 2ª edición. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill; 1995.
4. Dudley DJ, Trautman MS, Mitchell M. Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: Evidence for a cytokine network at the choriodecidual interface. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76(2):404-410.
5. Raynor BD. Cytokines. *Adv Obstet Gynecol* 1996;3:27-46.
6. Casey ML, Cox SM, Beutler. Cachectin/tumor necrosis factor- α in human decidua. Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. *J Clin Invest* 1989;83:430-436.
7. Steinborn A, Von Gall Ch, Hildenbrand R, Stutte HJ, Kaufmann M. Identification of placental cytokine-producing cells in term and preterm labor. *Obstet Gynecol* 1998;91(3):329-335.
8. Radomski MW, Vallance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S. Platelet adhesion to human vascular endothelium modulated by constitutive and cytokine-induced nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1993;27:1380-1382.
9. Anderson GD. Comentario. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1758.
10. Sattar N, Gaw A, Packard Ch, Greer IA. Potential pathogenic roles of aberrant lipoprotein and fatty acid metabolism in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:614-620.
11. Schiff E, Friedman SA, Baumann P, Sibai BM, Romero R. Tumor necrosis factor alpha in pregnancies associated with preeclampsia or small-for-gestational-age newborns. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1224-1229.
12. Iwatani Y, Watanabe M. The maternal immune system in health and disease. *Current Opinion Obstet Gynecol* 1998;10:453-458.
13. Maejima M, Fujii T, Kozuma S, Okai T, Shibata Y, Taketani Y. Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:79-82.
14. Münz C, Holmes N, King A, Locke YW, Colonna M, Schild H, et al. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA-A) molecules inhibit NKAT3-expressing natural killer cells. *J Exp Med* 1997;185:385-391.

15. Wang H, Zhang M, Soda K, Sama A, Tracey KJ. Fetuin protects the fetus from TNF. *Lancet* 1997;350:861-862.
16. Rivera DL, Ollister SM, Liu X, Thompson JH, Zhan XJ, Peunline K, et al. Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. *FASEB J* 1998;12:189-197.
17. Haddad EK, Duclos AJ, Anteck E, Lapp WS, Baines MG. Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss. *Cell Immunol* 1997;181:68-75.
18. Gorivodsky M, Zemlyak I, Orenstein H, Savion S, Fein A, Torchinsky A, et al. TNF-alpha messenger RNA and protein expression in the uteroplacental unit of mice with pregnancy loss. *J Immunol* 1998;160:4280-4288.
19. Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittrucker HW, Levy GA. Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fg12 prothrombinase. *J Immunol* 1998;160:545-549.
20. Maury CPJ, Teppo AM. Raised levels of cachectin/tumor necrosis factor-alpha in renal allograft rejection. *J Exp Med* 1987;166:1132-1137.
21. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mossmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-356.
22. Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, Hishina H, Kozuma S, Mikami Y, et al. Evidence for an elevation in serum interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha levels before the clinical manifestations of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:89-93.
23. Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y. Altered expressions of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblast in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anticytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol* 1996;36:349-358.
24. Ranges GE, Zlotnik A, Espervik T, Dinarello CA, Cerami A, Paladino MA. Tumor necrosis factor-alpha/cachectin is a growth factor for thymocytes. Synergistic interactions with other cytokines. *J Exp Med* 1998;167:1472-1478.
25. Cornelius P, Marlowe M, Lee MD, Pekala PH. The growth factor-like effects of tumor necrosis factor - alpha. Stimulation of glucose transport activity and induction of glucose transporter and immediately gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 1990;265:2506-2516.
26. Spiegelman BM, Hotamisligil GS. Through thick and thin: wasting, obesity and TNF-alpha. *Cell* 1993;73:625-627.
27. Lassarre C, Hardouin S, Dattos F, Frankenne F, Binoux M. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationship with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatric Res* 1991;29:219-225.
28. Romero R, Mazor M, Brandt S, Sepúlveda W, Avila C, Cotton DB, et al. Interleukin 1-alpha and interleukin-1-beta in preterm and term human parturition. *Am J Reprod Immunol* 1992;27:117-123.
29. Romero R, Mazor M, Sepúlveda W, Avila C, Copeland D, Williams J. Tumor necrosis factor-alpha in term and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1576-1587.
30. Santhanam U, Avila C, Romero R, Viguet H, Ida N, Sakurai S, et al. Cytokines in normal and abnormal parturition: Elevated IL-6 amniotic fluid levels in women with premature rupture of membranes associated with intrauterine infection. *Cytokine* 1991;3:155-163.
31. Minakamini H, Oka N, Sato T, Tamada T, Yasuda Y, Hirota N. Pre-eclampsia: A microvesicular fat disease of the liver? *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:1043-1047.
32. Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. Tumor necrosis factor-alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1752-1759.
33. Mincheva L, Hammarstrom S, Hammarstrom M. Human decidual leukocytes from early pregnancy contain high number of cells and selective down-regulation of alloreactivity. *J Immunol* 1992;149:2203-2211.

— . —

CURSO DE ACTUALIZACIÓN EN OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA
AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS
FEDERACIÓN MEXICANA DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

5 al 11 de septiembre de 1999, Morelia, México.
Información: ACOG 409 12th Atreet, SW PO Box 96920
Washington DC. 20090-6920
Telef. 800 673.8444 Fax: (202) 488.0787
e-mail: asrm@asrm.org. URL www.asrm.org

— . —

“CONJOINT ANNUAL MEETING OF THE”
AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE
AND THE
CANADIAN FERTILITY AND ANDROLOY SOCIETY

25 al 30 de septiembre de 1999, Toronto, Canada
Información: ASRM. 1209 Montgomery Highway
Alabama, USA 35216-2809
Telef. 205.978.5000 Fax: 205.978.5018
e-mail: asrm@asrm.org. URL www.asrm.org

— . —

“8th MEETING OF THE EUROPEAN PLACENTA GROUP”
VIII CONGRESO DEL GRUPO EUROPEO DE PLACENTA”

26 al 29 de septiembre de 1999, Schladming, Austria
Información: Institute of Histology and Embryology, Karl-Franzens University Graz
Harrachgasse 21/7 A-8010 Graz, Austria
Telef. +43 316 380 4233 Fax: +43 316 380 9625
e-mail: epg99.histo@kfunigraz.ac.at

— . —

“VI CONGRESO
SOCIEDAD IBEROAMERICANA DE ENDOSCOPIA GINECOLÓGICA E IMÁGENES
(SIAEGI)”

11 al 16 de octubre de 1999, Alcalá de Henares, Sevilla
Información: Viajes Pompeya
CICMA 1023 c/Emilio Ferrari 75. 28017 Madrid, España
Telef. 91 367 43 99 Fax: 91 368 04 02
e-mail: viajespompeya@mx4.redestb.es

— . —