

**El sistema TNF- α i els seus receptors:
implicació en la infecció perinatal i en el
desencadenament del part**

Carme Sàrries i Gené

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Pediatria, Ginecologia i Obstetrícia i
Medicina Preventiva

**El sistema TNF- α i els seus receptors: implicació en la
infecció perinatal i en el desencadenament del part**

Tesi presentada per Carme Sàrries i Gené per optar al títol de
doctora en Medicina

Dirigida pel Dr. Guillem Pintos i Morell

Badalona, desembre de 2002

En Guillem Pintos i Morell, Professor titular del Departament de Pediatria, Ginecologia i Obstetrícia i Medicina Preventiva de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que la Tesi Doctoral titulada: **“El sistema TNF- α i els seus receptors: implicació en la infecció perinatal i en el desencadenament del part.”**, ha estat realitzada per Carme Sàrries i Gené sota la seva direcció, i és apta per ser defensada davant del Tribunal i optar al grau de doctora en Medicina.

Signat Guillem Pintos i Morell

Badalona, desembre de 2002

Al Miquel

i a la meva família

Agraïments

Vull agrair molt especialment al Dr. Guillem Pintos Morell haver-me brindat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral sota la seva direcció i tutela, per haver-me introduït en el món de la investigació, per la confiança que ha dipositat en mi i el suport i estímul constant al llarg de tots aquests anys.

Al Dr. Carlos Rodrigo, cap del Servei de Pediatria, pels seus valuosos consells referents a la sèpsia neonatal.

A tots els membres del Servei de Pediatria (Dr. Javier, Dr. Bel, Dr. Alcázar, Dr. Roca, Dra. Artigas i a l'Helena Joan) per la seva bona acollida i per l'ajut brindat en nombroses ocasions. Voldria agrair molt especialment als doctors Wifredo Coroleu i Antoni Natal, de la Unitat de Neonatologia, la seva col·laboració sense la qual no hagués estat possible la realització d'aquest treball.

Al Dr. Emilio Pérez-Picañol m'agradaria agrair-li la seva inestimable col·laboració i tot el que m'ha ensenyat sobre els "misteris" de la ginecologia.

A la Dra. Núria Verdú dels Servei de Ginecologia i Obstetrícia pel seu ajut desinteressat en la recollida de mostres i de les dades clíniques.

A la Dra. Cristina Navarrete i al seu grup del North London Transfusion Centre per la seva col·laboració en el tipatge de l'HLA.

A la Dra. Dolores Jaraquemada li agraeixo el seu ajut i consell en el disseny de l'estudi i en la interpretació dels resultats de l'HLA.

A tots els membres de la Unitat d'Immunologia, especialment als doctors Ricardo Pujol i Manel Juan per tots els seus consells en l'elaboració d'aquest treball i el seu suport.

Als companys amb qui vam començar junts l'aventura del Centre d'Investigacions Sanitàries (CIS), Miquel Taron, Sònia Higuero, Rosa Prats i Ramon Bartolí i sense els quals no hagués estat possible la creació del laboratori, la meva gratitud per les bones estones compartides, que van ser moltes, el seu suport i la seva companyonia.

Als membres actuals del CIS, Marian, Sònia, Sandra, Eva, Carmen i Adolfo pel suport, amistat i comprensió que m'han mostrat en tot moment.

Als companys del laboratori de Biologia Molecular del Càncer, Pepe, Bàrbara, Laura, Pedro, Noemí, Cristina, Itziar, Mònica, Aurora i Dani per haver aportat un alè d'aire fresc, pel seu bon humor etern i per haver-me fet recuperar la il·lusió dels qui comencen.

A la Laura Alcalde per haver compartit amb mi el seu bagatge de coneixements en biologia molecular i pel seu ajut en la transfecció de cèl·lules. A la Pilar Armengol vull agrair-li tot el seu ajut, sobretot amb els cultius cel·lulars. A la Mercè Martí per haver estat sempre disposada a donar-me un cop de mà. A la Marta Vives, Núria Somoza, Mireia Sospedra i Carme Roure tot el que m'han ensenyat de les tincions i la citometria de flux. A la Marta Catàlfamo i a la Laurence Serradell per totes les llargues hores compartides hibridant. Gràcies per la seva col·laboració durant tot aquest temps a l'Edgardo, al Xavi, la Pepi i la Lúdia.

A totes les infermeres de la Unitat de Neonatologia i a les llevadores per la seva col·laboració en la recollida de mostres.

A les mares que amb el seu permís per a l'obtenció de mostres seves i dels seus fills, han fet possible aquest estudi.

Al Dr. Rafael Rosell, cap del servei d'Oncologia Mèdica, per haver-me donat l'oportunitat de poder continuar la meva carrera com a investigadora.

El meu record al Dr. Jordi Prats, prematurament desaparegut. El seu suport fou fonamental des del primer moment.

Finalment, vull agrair molt especialment al Miquel i a la meva família el seu suport i afecte que m'han ajudat a superar tots els mals moments. També vull disculpar-me amb ells per tot el temps que per la meva feina no els hi he pogut dedicar.

Aquest treball s'ha pogut realitzar gràcies a les beques concedides pel Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 95/0537 i FIS 97/1055).

ÍNDIX

Abreviatures	VI
I. Introducció	1
1.1. Citocines i gestació	2
1.1.1. Les citocines	2
1.1.2. La resposta Th1/Th2	3
1.1.3. Modulació immunològica en la gestació	5
1.2. El TNF-α i els seus receptors	8
1.2.1. Estructura proteica del TNF- α	8
1.2.2. Regulació de la síntesi de TNF- α	10
1.2.3. Els receptors del TNF- α	12
1.2.4. Transducció de senyal	16
1.2.4.1. Iniciació de la senyalització	16
1.2.4.2. Proteïnes adaptadores	17
1.2.4.3. Activació gènica per transducció de senyals proinflamatoris i antiapoptòtics del TNF- α	18
1.2.4.4. Mort cel·lular induïda pel TNF- α	20
1.2.4.5. Paper de les esfingomielinases en la senyalització del TNF- α	21
1.2.4.6. Paper del mitocondri	22
1.3. Activitats biològiques del TNF-α	24
1.4. El TNF-α en les infeccions perinatales	27
1.4.1. Les infeccions intrauterines	27
1.4.1.1. La corioamnionitis aguda	27
▪ Etiopatogènia	27
▪ Microorganismes implicats	28
▪ Vaginosis bacteriana	29
▪ Diagnòstic de les infeccions intrauterines	29
1.4.1.2. Infeccions neonatals adquirides durant el part	30
1.4.1.3. Conseqüències de les infeccions intrauterines	30
1.4.2. La ruptura prematura de membranes	32
1.4.2.1. Estructura de les membranes fetals	33
1.4.2.2. Mecanismes de la ruptura de membranes abans i durant el part	34
▪ Canvis en el contingut, l'estructura i el catabolisme del col·lagen	35
1.4.2.3. Fisiopatogènia de la ruptura prematura de membranes	36
1.4.2.4. Conseqüències neonatals de la ruptura prematura de membranes	39
1.4.3. La Prematuritat	41
1.4.3.1. Etiopatogènia del part preterme	42
1.4.3.2. Paper de les citocines en el part preterme	44

1.4.3.3. El TNF- α com a mitjancer del part preterme	46
1.4.3.4. Tractament de la infecció per a la prevenció del part preterme	47
1.4.3.5. Conseqüències neonatals de la prematuritat	48
1.4.4. El TNF- α en la sèpsia neonatal de transmissió vertical i en el xoc sèptic	50
▪ Definicions	50
1.4.4.1. Epidemiologia de la sèpsia neonatal vertical	52
▪ Incidència	52
▪ Etiologia	53
1.4.4.2. Fisiologia de la inflamació	54
1.4.4.3. Fisiopatologia de la síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica	56
1.4.4.4. Mitjancers de la síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica	57
1.4.4.5. El TNF- α en la síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica	58
1.4.4.5.1. Efectes proinflamatoris del TNF- α	60
▪ Efectes en les cèl·lules endotelials	60
▪ Efectes en el fetge	62
▪ Efectes en el sistema cardiovascular	62
▪ Efectes en la musculatura	63
▪ Efectes en el teixit adipós	64
1.5. La immunogenètica de les malalties infeccioses	65
1.5.1. La influència del component genètic	65
1.5.2. Estudis d'associació de gens candidats	67
1.5.2.1. Estudis de l'HLA	67
1.5.2.2. Les citocines com a gens candidats	68
1.5.3. Els polimorfismes del gen del TNF- α	69
1.5.3.1. Localització cromosòmica del gen del TNF- α	69
1.5.3.2. Polimorfismes de microsatèl·lit del gen del TNF- α	70
1.5.3.3. Polimorfismes de canvi d'una base del gen del TNF- α	70
<i>II. Hipòtesi</i>	73
<i>III. Objectius</i>	77
<i>IV. Resultats</i>	82
4.1. Resultats objectiu 1	83
4.1.1. Característiques de la població d'estudi	84
4.1.2. Anàlisi de les concentracions dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 en sang perifèrica materna i en sang de cordó presents en el part normal	85
4.1.3. Anàlisi de les concentracions dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 en sang perifèrica materna, líquid amniòtic i sang de cordó en el part amb risc i signes d'infecció	86

4.1.4. Determinació de l'expressió dels receptors TNFR-p55 i p75 de membrana en cèl·lules limfocitàries obtingudes de sang perifèrica i de sang de cordó durant el part normal	90
4.1.5. Comparació de l'expressió dels receptors de membrana TNFR-p55 i p75 en el part normal i en el part amb risc o signes d'infecció	93
4.1.6. Estudi de l'expressió gènica dels receptors TNFR-p55 i p75 en sang perifèrica materna i en sang de cordó	95
4.2. Resultats objectiu 2	98
4.2.1. Característiques de la població d'estudi	99
4.2.2. Determinació de les concentracions plasmàtiques de TNF- α	101
4.2.3. Determinació de les concentracions plasmàtiques dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75	101
4.2.4. Anàlisi de la sensibilitat i de l'especificitat de les concentracions del TNF- α i dels seus receptors solubles com a factor predictiu de sèpsia neonatal	104
4.2.5. Anàlisi de la correlació entre la modulació dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 i l'evolució clínica de la malaltia infecciosa neonatal	105
4.3. Resultats objectiu 3	107
4.3.1. Característiques de la població d'estudi	108
4.3.2. Determinació de la freqüència del polimorfisme en la població espanyola i la seva associació amb els diferents haplotips del Sistema Major d'Histocompatibilitat de classe I o de classe II	110
4.3.2.1. Anàlisi de la freqüència dels al·lels TNFA1 i TNFA2	110
4.3.2.2. Anàlisi d'associació dels al·lels TNFA1 i TNFA2 amb l'HLA	112
4.3.2.2.1. Descripció de les freqüències al·lèliques de l'HLA en la població espanyola analitzada	113
4.3.2.2.2. Anàlisi d'associació dels al·lels TNFA1 i TNFA2 amb l'HLA de classe I i classe II	116
4.3.3. Anàlisi de l'associació del polimorfisme amb una major susceptibilitat a presentar naixements prematurs espontanis després d'un part preterme idiopàtic o d'una ruptura prematura de membranes fetals	119
4.3.3.1. Freqüència genotípica del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- α	119
4.3.3.2. Freqüència al·lèlica del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- α	121
4.3.4. En cas que hi hagi una associació entre el polimorfisme i un major risc de prematuritat, analitzar si aquesta associació pot ser atribuïda a un desequilibri de lligament amb algun al·lel del Sistema Major d'Histocompatibilitat de classe I o de classe II	123
4.3.4.1. Anàlisi d'associació dels al·lels TNFA1 i TNFA2 amb l'HLA de classe I i de classe II	123
4.3.4.2. Anàlisi d'associació de l'HLA amb la ruptura prematura de membranes	125
V. Discussió	127
VI. Conclusions	151

VII. Material i mètodes	154
7.1. Població d'estudi	155
7.2. Obtenció i processament de les mostres	158
7.2.1. Obtenció i processament de les mostres de sang	158
7.2.2. Obtenció i processament de les mostres de líquid amniòtic	158
7.3. Cultius cel·lulars	160
7.3.1. Cultiu de les cèl·lules HL60	160
7.3.2. Obtenció de PBMC	160
7.3.3. Cultiu i estimulació de PBMC	161
7.4. Determinació dels receptors p55 i p75 de membrana	162
7.4.1. Preparació de les mostres	162
7.4.2. Anticossos	163
7.4.3. Tincions en sang total	163
7.4.4. Anàlisi de les tincions. Citometria de flux	164
7.5. Determinació de les concentracions plasmàtiques i en líquid amniòtic de TNF i sTNFR	165
7.5.1. ELISA	165
7.5.2. IRMA	165
7.6. Anàlisi de l'expressió d'mRNA per Northern blot	167
7.6.1. Obtenció d'RNA total	167
7.6.2. Quantificació de l'RNA	168
7.6.3. Obtenció de les sondes	168
7.6.3.1. Plàsmids utilitzats	168
7.6.3.2. Transformació bacteriana per electroporació	169
7.6.3.3. Obtenció de DNA plasmídic	170
7.6.3.4. Obtenció del cDNA	171
7.6.4. Electroforesi en gel d'agarosa desnaturalitzant	173
7.6.4.1. Preparació de les mostres	173
7.6.4.2. Preparació del gel	173
7.6.4.3. Electroforesi	173
7.6.5. Transferència a membrana de niló	173
7.6.6. Hibridació amb la sonda complementària marcada amb ³² P	174
7.6.6.1. Pre-hibridació de la membrana	174
7.6.6.2. Hibridació de la membrana	174
7.6.6.3. Marcatge de les sondes	174
7.6.6.4. Rentats de la membrana	175
7.6.7. Exposició a pel·lícula fotogràfica i revelat	175
7.6.8. Quantificació i anàlisi per densiometria	175
7.7. Anàlisi del polimorfisme -308 pb del promotor del TNF-α	177

7.7.1. Preparació de les mostres	177
7.7.2. Obtenció de DNA genòmic	177
7.7.3. Quantificació i visualització del DNA	178
7.7.4. Obtenció dels estàndards	178
7.7.5. AS-PCR	181
7.7.5.1. Condicions de la PCR	182
7.7.5.2. Cicles de la PCR	182
7.7.5.3. Visualització dels productes amplificats	183
7.7.6. Seqüenciació	183
7.7.6.1. Amplificació per PCR	183
7.7.6.2. Purificació dels productes amplificats	184
7.7.6.3. Reacció de seqüenciació	184
7.7.6.4. Purificació dels productes de la seqüenciació	185
7.7.7. Tipificació del genotip HLA	185
7.8. Anàlisi estadística	186
<i>VIII. Bibliografia</i>	189

Abreviatures

A	adenina
AA	aminoàcid
DNA	àcid desoxiribonucleic
cDNA	àcid desoxiribonucleic complementari
AP-1	proteïna activadora 1
APP	amença de part preterme
ARDS	síndrome del destret respiratori en adults
RNA	àcid ribonucleic
mRNA	àcid ribonucleic missatger
AS-PCR	reacció en cadena de la polimerasa específica d'al·lel o <i>allele-specific polymerase chain reaction</i>
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ASM	esfingomielinasa àcida lisosomal/endosomal
ATF	<i>activating transcription factor</i>
BAT-	<i>HLA-B associated transcript</i>
C	citosa
CARDIAK	<i>RIP-like kinase</i>
CAT	gen de la cloranfenicol acil transferasa
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CKII β	caseïna quinasa II beta
[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP	desoxicitosin trifosfat marcat amb l'isòtop ^{32}P
DEPC	dietilpirocarbonat
DD	<i>death domain</i>
ddNTP	dideoxinucleòtid trifosfat
DMSO	dimetilsulfòxid
dNTP	deoxinucleòtid trifosfat
DO	densitat òptica
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
ELAM-1	molècula 1 d'adhesió leucòcit-endoteli
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FADD/MORT	<i>Fas-associated death domain</i>
FCS	sèrum boví fetal
G	guanina
GCKs	<i>germinal center kinase</i>
GM-CSF	factor estimulator de les colònies de granulòcits i macròfags
g	grams
HCl	àcid clorhídric
HSP-70	<i>heat shock protein 70</i>

ICAM-1	molècula 1 d'adhesió intercel·lular
I κ B	<i>inhibitor of NF-κB</i>
IFN- γ	Interferò gamma
IgG	immunoglobulina G
IL-	Interleucina
JNK/SAPK	<i>c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase</i>
Kb	kilobase
KD	kilodalton
L	litre
LB	medi de cultiu <i>Luria-Bertrani</i>
LPS	lipopolisacàrid
MAP	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEKK	<i>mitogen-activated ER kinase</i>
M	molar
mg	mil·ligram
μ g	microgram
MgCl ₂	clorur de magnesi
MHC	Complex Major d'Histocompatibilitat
ml	mil·lilitre
μ l	microlitre
mM	mil·limolar
μ M	micromolar
MMP	metal·loproteïnases de matriu extracel·lular
NaCl	clorur sòdic
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	fosfat sòdic
NaOH	hidròxid sòdic
nM	nanomolar
nm	nanòmetres
MODS	síndrome de la disfunció multiorgànica
MOPS	àcid 3-(N-Morfolí) propanosulfònic
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NF- κ B	factor nuclear κ B
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NK	<i>natural killer</i>
nM	nanomolar
NSM	esfingomielinasa neutral de membrana
OR	oportunitat relativa o <i>odds ratio</i>
PAF	factor activador plaquetari
PAI	factor inhibidor del plasminogen
pb	parells de bases

PBMC	cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
PBS	tampó fosfat salí
PCR	proteïna C reactiva
PDGF	factor de creixement derivat de plaquetes o <i>platelet-derived growth factor</i>
pg	picogram
PHA	fitohemaglutinina
PM	pes molecular
PMN	polimorfonucleòcits
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RPM	ruptura prematura de les membranes fetals
rpm	revolucions per minut
SDS	sulfat dodecil de sodi o lauril sulfat de sodi
SGB	<i>Streptococcus agalactiae</i> beta-hemolític del grup B
SIRS	síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica
SODD	<i>silencer of death domains</i>
SSC	citrat salí de sodi
SSPE	solució salina de fosfat sòdic amb EDTA
sTNFR-p55	receptor soluble p55 del factor de necrosi tumoral alfa
sTNFR-p75	receptor soluble p75 del factor de necrosi tumoral alfa
T	timina
TA	tensió arterial
TAE	tampó Tris-acetat-EDTA
TACE	enzim convertidor del factor de necrosi tumoral alfa
TBE	tampó Tris-àcid bòric-EDTA
TE	tampó Tris-EDTA
TGF- β	factor de creixement transformador o <i>transforming growth factor beta</i>
Th1	limfòcit T <i>helper</i> de tipus 1
Th2	limfòcit T <i>helper</i> de tipus 2
TIMP	inhibidor tissular de les metal·loproteïnases
TNF- α	factor de necrosi tumoral alfa o <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNF- β	factor de necrosi tumoral beta o limfotoxina alfa o <i>tumor necrosis factor beta</i>
TNFR-p55	receptor p55 del factor de necrosi tumoral alfa
TNFR-p75	receptor p75 del factor de necrosi tumoral alfa
TRADD	<i>TNF receptor-associated death domain</i>
TRAF	factor associat al receptor del TNF o <i>TNF receptor-associated factor</i>
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometà
VCAM-1	molècula 1 d'adhesió de cèl·lules vasculars

PART
I

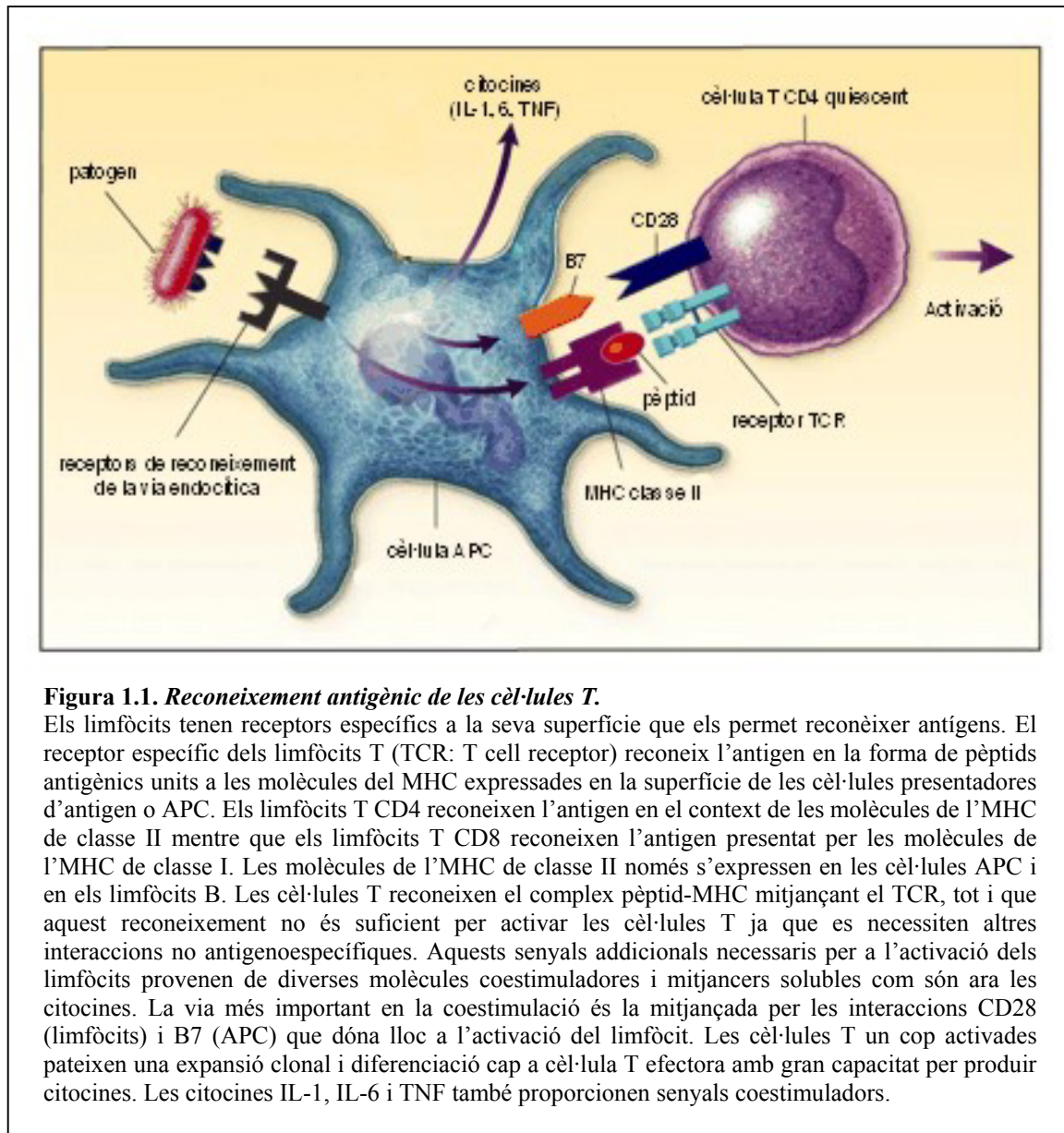
Introducció

1.1. Citocines i gestació

1.1.1. Les citocines

“Citocina” és un terme que agrupa un conjunt de proteïnes produïdes per diferents tipus cel·lulars, principalment per les cèl·lules del sistema immunològic, que tenen una funció fonamental en la coordinació de la resposta immunològica i inflamatòria i també són importants en la senyalització per a la diferenciació i proliferació cel·lular. Les citocines exerceixen les seves funcions mitjançant la unió a receptors específics que es troben en la membrana de les cèl·lules. La unió d’una citocina al seu receptor inicia una sèrie de processos moleculars que transdueixen el senyal a la seva diana intracel·lular i que al capdavant donarà lloc a la resposta biològica. La resposta selectiva a les citocines d’un determinat tipus cel·lular depèn, almenys en part, del repertori de receptors de citocines que expressen les cèl·lules, el qual és específic de cada tipus de cèl·lula, i de l’etapa del desenvolupament en què aquestes es troben. A més a més, l’expressió d’un receptor pot ser modificada per nombrosos factors de transcripció i per les mateixes citocines.

Les citocines es subdivideixen en diferents grups, que inclouen les hematopoetines, els interferons, les molècules de la família del TNF, la superfamília de les immunoglobulines i les quemoquines. Tanmateix, aquest heterogeni grup de proteïnes té diferents característiques en comú: 1) les citocines són proteïnes de baix pes molecular (< 80 KD) que sovint estan glicosilades. 2) Participen en la regulació de l’amplitud i duració de la resposta immunològica i inflamatòria. 3) Normalment són produïdes de forma transitòria i local. 4) Les citocines són extremament potents, i actuen generalment a concentracions picomolars. 5) Les citocines interactuen amb receptors d’alta afinitat a la membrana cel·lular específics per a cada citocina o grup de citocines. 6) Les citocines són molècules pleiotròpiques ja que d’una banda cada citocina pot activar diferents respostes quan interacciona amb diferents tipus cel·lulars i de l’altra una única citocina pot activar diferents funcions en una mateixa cèl·lula. 7) Citocines diferents poden tenir funcions solapades i donar lloc a efectes similars en les mateixes cèl·lules o en tipus cel·lulars diferents. 8) Les citocines interaccionen en una xarxa on s’indueixen entre si, transmodulen l’expressió dels receptors de les citocines i interaccionen de forma sinèrgica, additiva o antagonica en la funció cel·lular.



1.1.2. La resposta Th1/Th2

Els limfòcits T amb receptor específic d'antigen TCR- $\alpha\beta$ es divideixen en dos subpoblacions cel·lulars segons si expressen coreceptors CD4 o CD8. Les cèl·lules T CD8 són les responsables de la citotoxicitat cel·lular i eliminen directament les cèl·lules portadores d'antígens derivats de patògens intracel·lulars, principalment de virus. Les cèl·lules T CD4 activades, responsables de la immunitat enfront de bacteris i paràsits, es divideixen en dues poblacions funcionals segons el patró de citocines que secreten. Els limfòcits T CD4 Th1 produeixen IL-2, IFN- γ , TNF- α o - β i IL-12 i són les responsables de

la resposta immunològica cel·lular. Les cèl·lules T CD4 Th2 produeixen IL-4, IL-5, IL-6 i IL-13. L'IL-10 va ser inicialment descrita com un producte de les cèl·lules Th2, això no obstant, s'ha demostrat que també és secretada per les cèl·lules Th1. Aquest patró de citocines afavoreix la producció d'immunoglobulines per les cèl·lules B, principalment dels isotips IgE i IgG4, l'activació de basòfils i mastòcits i l'increment en la producció d'eosinòfils.

La diferenciació de les cèl·lules T a Th1 està influïda per diferents factors, sent el més important la secreció d'IL-12 (produïda per les cèl·lules dendrítiques i els monòcits). La diferenciació cap a cèl·lules efectores Th2 està determinada per l'exposició de les cèl·lules T CD4 a l'IL-4. La font d'IL-4 per induir la diferenciació encara no s'ha definit, però s'ha suggerit que podrien ser les mateixes cèl·lules T activades, les cèl·lules T NK, els mastòcits o els basòfils.

Les cèl·lules T CD8, igual que les cèl·lules CD4, secreten patrons de citocines de tipus 1 i de tipus 2, per la qual cosa s'han definit com a cèl·lules T Tc1 i Tc2. Les cèl·lules T Tc1 serien les efectores citotòxiques de la resposta immunològica. La funció de les cèl·lules T Tc2 no s'ha determinat, s'ha suggerit, però, que podrien estar involucrades, igual que les Th2, en la resposta humoral com a ajuda a les cèl·lules B o com una població de cèl·lules T reguladores que limiten la resposta inflamatòria.

Taula 1.1. Característiques de les cèl·lules Th1 i Th2.

-
-
- Les cèl·lules Th1 indueixen diferents reaccions citotòxiques i inflamatòries mitjançades per l'IL-2, l'IFN- γ , el TNF i l'IL-12 i són responsables de les reaccions inflamatòries produïdes per cèl·lules, de la reacció d'hipersensibilitat retardada i del dany tissular en les malalties autoimmunes.
 - Les cèl·lules Th2 produeixen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 i estimulen les cèl·lules B perquè produeixin anticossos.
 - Les citocines Th1 i Th2 s'inhibeixen mútuament, és a dir, una resposta de tipus Th2 tendeix a inhibir les respostes de tipus Th1 i a l'inrevés.
 - En les cèl·lules CD8⁺ (Tc) també existeix una dicotomia basada en la producció de citocines; les cèl·lules Tc1 secreten un patró de citocines tipus 1 mentre que les Tc2 secreten un patró tipus 2.
 - El patró de producció de citocines sembla que es deu a diferents tipus cel·lulars; algunes citocines sintetitzades a la interfase maternofetal deriven de cèl·lules no T.
-

1.1.3. Modulació immunològica en la gestació

Nombroses evidències clíniques indiquen que durant l'embaràs es produeixen canvis immunològics caracteritzats per una resposta predominantment humoral i amb manca de resposta immunològica cel·lular. Així, s'ha observat que aproximadament el 70% de dones amb artritis reumatoide (una malaltia autoimmunitària mitjançada per cèl·lules) experimenten una remissió temporal dels símptomes durant l'embaràs (Da Silva JA i col·l., 1992). En canvi, el Lupus eritematós sistèmic, en el qual la principal patologia es deu a una excessiva producció d'autoanticossos, tendeix a empitjorar durant l'embaràs (VRNAer MW, 1991). Existeixen, també, nombroses malalties infeccioses causades per patògens intracel·lulars que empitjoren en l'embaràs; dins d'aquesta categoria de malalties estarien incloses la lepra, la malària, la coccidioidomicosi, la toxoplasmosi i la tuberculosi, entre altres (Weber DJ i col·l., 1984; Watkinson M i col·l., 1983). Tot això va portar Wegmann i col·laboradors (1993) a postular, i més tard a demostrar, que en l'embaràs normal es produeix un canvi cap a una reactivitat de tipus Th2 i una manca de reactivitat Th1.

S'ha descrit que certes citocines poden ser beneficioses per al correcte desenvolupament del fetus; això va fer pensar que una deficiència d'aquestes citocines podria donar lloc a una placentació deficient, a un creixement fetal anormal o fins i tot a la mort del fetus (Wegmann TG i col·l., 1993). D'altra banda, algunes citocines proinflamatòries (Th1) poden tenir efectes adversos sobre el fetus ja sigui per una activitat embriotòxica directa o bé per dany al trofoblast (Raghupathy R, 1997; Hill JA, 1991): l'IFN- γ n'inhibeix el creixement *in vitro*, mentre que el TNF- α inhibeix el desenvolupament fetal així com la proliferació de línies cel·lulars humanes derivades de trofoblast *in vitro* (Haimovici F i col·l., 1991), a més a més de mitjançar la mort cel·lular per apoptosi en cèl·lules trofoblàstiques (Yui J i col·l., 1994). La dada més significativa és, però, que les citocines proinflamatòries IL-2, TNF- α i IFN- γ són capaces d'induir la finalització de l'embaràs quan han estat administrades a ratolins (Chaouat G i col·l., 1990).

Aquestes citocines Th1 poden danyar la placenta directament o indirectament via activació de cèl·lules citotòxiques (Hill JA i col·l., 1991). El TNF- α pot causar l'expulsió fetal per inducció de les contraccions uterines o pot produir necrosi de l'embrió implantat; alternativament, el TNF pot actuar trombosant la sang subministrada al fetus. Les citocines Th1 poden a més a més, activar les cèl·lules NK. L'activitat d'aquestes cèl·lules ha estat

inqüestionablement lligada a l'avortament espontani en ratolins mentre que en humans s'ha demostrat l'existència de nivells augmentats de cèl·lules NK perifèriques en dones embarassades amb història d'avortaments espontanis recurrents, en comparació amb controls de dones amb embarassos normals (Kwak JY i col·l., 1995). Els resultats dels estudis en models animals d'avortaments espontanis suggereixen la possibilitat que les cèl·lules T maternes, en determinades situacions, poden respondre a l'estimulació dels antígens fetoplacentaris de forma aberrant, produint citocines Th1.

Les citocines Th1, tot i que tenen un paper essencialment nociu durant la major part del període de gestació, poden tenir una funció fonamental segons el moment, el lloc i la concentració relativa en què s'expressin. Per exemple, el TNF- α té una funció essencial en el període de preimplantació, mitjançant la comunicació entre cèl·lules embriològiques i cèl·lules uterines maternes i en l'establiment de la gestació (Haimovici F i col·l., 1993; Chard T, 1995). El TNF- α matern intervé en la regulació del creixement del trofoblast i en la diferenciació durant les primeres etapes del desenvolupament (Tartakovsky B i col·l., 1991). Estudis en ratolins *knockout* han demostrat que el TNF- α també és necessari per a un creixement i una funció normal de la placenta (Hunt JS, 1996). Finalment, el TNF- α també té un paper fonamental en el desencadenament del part normal ja que estimula les contraccions del miometri i participa en el trencament de les membranes fetals.

L'efectivitat, per tant, de la resposta NK/IFN- γ /TNF- α per induir la finalització de la gestació, suscita la possibilitat que una inversió ràpida del biaix de citocines Th2 podria tenir un paper important en el desencadenament del part a terme. El paper del TNF en el desencadenament del part es discutirà més detalladament en apartats posteriors.

Aquest model pot tenir dues conseqüències principals: 1) L'embaràs pot comprometre l'èxit immunològic enfront a patògens intracel·lulars que requereixen d'una resposta Th1 per a la resolució de la infecció i 2) Una resposta aguda Th1 contra una infecció pot conduir a la pèrdua fetal.

Són moltes les qüestions que queden per contestar en aquesta àrea de la biologia i la fisiologia. Potser una de les més interessants és desenvolupar mètodes de diagnòstic i prevenció d'alteracions com ara l'avortament recurrent, la prematuritat, etc. Mancaria determinar si aquests es basaran en la detecció de concentracions elevades de determinades citocines en la circulació o en el tracte reproductiu. Abans, però, caldrà reunir informació

introducció

addicional més bàsica: quina o quines de les citocines són les més rellevants?, quins nivells són “*nocius*”?, què ocasiona la producció anòmala de citocines perjudicials en el tracte reproductiu? A més del diagnòstic, potser algun dia serà possible tractar aquests desordres fins i tot amb teràpies basades en citocines.

1.2. El TNF- α i els seus receptors

El *factor de necrosi tumoral α* (TNF- α) va ser originàriament descrit com un factor derivat de macròfags que podia induir necrosi hemorràgica en alguns tumors sòlids (Carswell EA i col·l., 1975). Posteriorment, aquesta activitat va ser clonada i expressada com una proteïna recombinant que exhibia activitat antitumoral *in vivo* (Pennica D i col·l., 1984). Independentment, el TNF- α va ser també identificat com a caquectina, un factor secretat per macròfags responsable de la caquèxia observada durant infeccions parasitàries cròniques (Beutler B and Cerami A, 1987). Des d'aleshores, el TNF- α s'ha relacionat amb un ampli rang de malalties inflamatòries, infeccioses i tumorals. A escala cel·lular, s'ha observat que el TNF- α modula un ampli espectre de respostes que inclouen l'activació de diferents gens que participen en la resposta inflamatòria, en la immunoregulació, la proliferació cel·lular, en la resposta antivírica, en la inhibició del creixement i en la mort cel·lular (Beutler B, 1995; Fiers W, 1991).

De forma general, el TNF- α actualment és vist principalment com un mediador endogen de la inflamació i les cèl·lules de l'endoteli vascular són la diana principal de les accions proinflamatòries d'aquesta citocina.

1.2.1. Estructura proteica del TNF- α

El TNF- α és un dels deu membres, fins al moment descrits, d'una família de proteïnes que activen una família paral·lela de receptors estructuralment relacionats (taula 1.2).

Tots els membres de la família del TNF són actius com a complexos trimèrics. Exceptuant-ne la limfotoxina- β (que consisteix en una subunitat limfotoxina- α i dues subunitats limfotoxina- β), la resta de components estan constituïts per tres subunitats idèntiques. Tots els membres de la família del TNF amb excepció de la limfotoxina- α (TNF- β) són glicoproteïnes de membrana de tipus II, constituïdes per un domini citoplasmàtic N-terminal relativament curt, un domini transmembrana hidrofòbic i una regió extracel·lular que conté una seqüència d'uns 150 aminoàcids, homòloga entre els diferents membres de la família. El grau d'homologia entre els diferents membres se situa entre el 14% i el 36%.

Taula 1.2. Exemple d'alguns membres caracteritzats de la família del TNF.

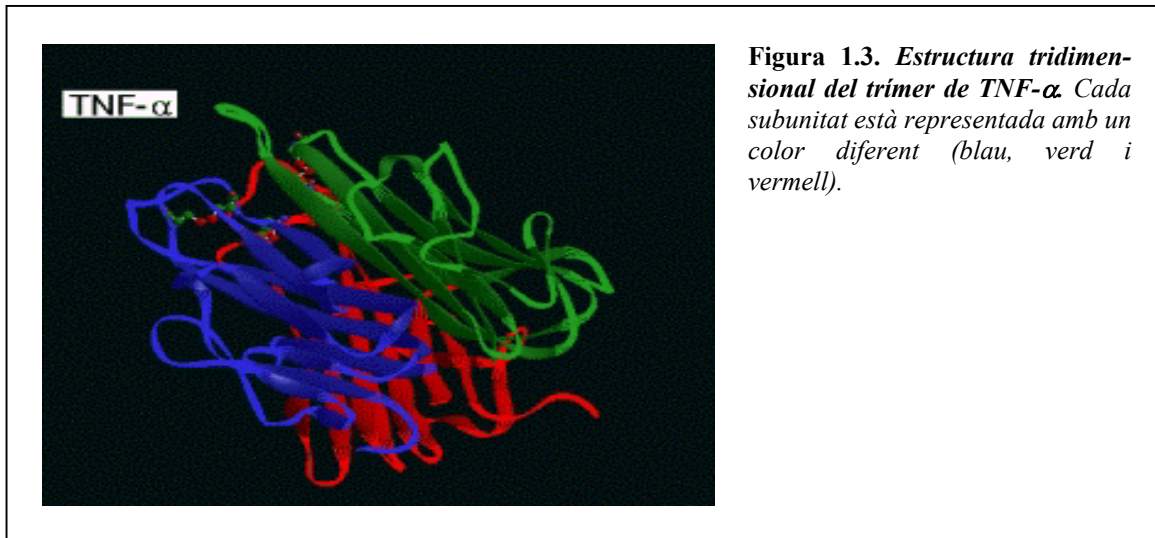
LLIGAND	CÈL·LULES PRODUCTORES DE LLIGAND	RECEPTOR	DISTRIBUCIÓ DELS RECEPTORS	CAPACITAT PER INDUIR APOPTOSI	MITJANCERS CITOPLASMÀTICS	MUTACIÓ O FENOTIP KNOCKOUT	
						LLIGAND	RECEPTOR
TNF i Limfotoxina- α	TNF: macròfags, limfòcits, queratinòcits, altres	Receptor TNF 55KD	Molts tipus cel·lulars	SÍ	TRADD, TRAP-1	TNF i limfotoxina- α : absència de nòduls limfàtics, menor resposta a lipopolisacàrids	Menor resposta a lipopolisacàrids, incapacitat per resoldre infeccions per <i>Listeria</i> o micobacteri
	Cèl·lules T	Receptor TNF 75KD	Molts tipus cel·lulars	SÍ	TRAF-1, TRAF-2	Limfotoxina- α : absència de nòduls limfàtics	Disminució de la proliferació de limfòcits; menor resposta dèrmica al TNF, disminució de la letalitat induïda pel TNF
Limfotoxina- β	Cèl·lules T, altres	Receptor de la limfotoxina- β	Cèl·lules T, cèl·lules B, etc	SÍ	LAP-1, CRAF-1	ND	ND
Fas lligand	Cèl·lules T	Receptor del Fas	Molts tipus cel·lulars	SÍ	FAP-1, FADD (MORT-1)	Limfoproliferació	Limfoproliferació
Nerve Growth factor (NGF)		Receptor del NGF	Neurones, altres	NO	ND		Neuropaties
Lligand CD40	Cèl·lules T	Receptor del Nerve Growth factor	Cèl·lules T, cèl·lules B	NO	CRAF-1, CAP-1	Immunodeficiència lligada al cromosoma X amb augment d'IgM i disminució o absència d'IgG, IgA, IgD	Immunodeficiència lligada al cromosoma X amb augment d'IgM i disminució o absència d'IgG, IgA, IgD
Lligand CD27	Cèl·lules T	CD27	Cèl·lules T	ND	ND	ND	ND
Lligand CD30	Cèl·lules T	CD30	Cèl·lules T	ND	ND	ND	ND
Lligand OX-40	Cèl·lules T	OX40	Cèl·lules T	ND	ND	ND	ND
Lligand 4-1BB	Cèl·lules T	4-1BB	Cèl·lules T	ND	ND	ND	ND

*TRADD: TNF-receptor-associated death domain, TRAP-1: TNF-receptor-associated protein 1, TRAF: TNF-receptor-associated factor, LAP-1: latent membrane protein type 1-associated factor, CRAF-1: CD40-receptor-associated factor 1, ND: no determinat, FAP-1: Fas-associated protein 1, FADD (o MORT-1): Fas-associated death domain i CAP-1: CD40-associated protein 1.

L'any 1988, M. Kriegler i col·laboradors van demostrar que la molècula de TNF- α biològicament activa existeix tant com una molècula secretada com també associada a les cèl·lules. El TNF- α és inicialment produït com una molècula precursora lligada a membrana amb una seqüència constituïda per 233 aminoàcids (PM 26 KD). Aquest precursor és processat proteolíticament per l'enzim convertidor del TNF- α (TACE), una adamolisina membre de la família de les metal·loproteïnases de matriu, per generar la proteïna madura de 157 residus (PM 17 KD) que és secretada (Moss ML i col·l., 1997; Black RA i col·l., 1997).

La molècula de TNF- α conté dos residus de cisteïna en les posicions 69 i 101, connectats per un pont disulfur. Les anàlisis de mutagènesi dirigida han demostrat que l'absència d'aquest pont disulfur comporta la disminució de diverses activitats biològiques característiques del TNF- α , ara com la citotoxicitat, l'activació dels macròfags o la inhibició de la lipogènesi sense afectar l'estructura secundària o terciària de la molècula.

El TNF- α està constituït per dues fulles β formades per vuit cadenes β antiparal·leles que donen lloc a una estructura de *β -jellyroll*. Cada subunitat s'associa de forma no covalent en trímers, els quals constitueixen la forma biològicament activa del TNF- α (fig. 1.3).



1.2.2. Regulació de la síntesi del TNF- α

El TNF- α el sintetitzen principalment cèl·lules mononuclears (monòcits i macròfags), encara que existeixen altres tipus cel·lulars amb aquesta capacitat (Mathews M, 1981). Així, per exemple, els limfòcits T aïllats de sang perifèrica són capaços de produir TNF- α (Sung SJ i col·l., 1988; Cuturi MC i col·l., 1987). És interessant ressaltar que la producció de TNF- α pels limfòcits succeeix tant en cèl·lules CD4+ com en CD8+. Finalment, les cèl·lules B també poden ser induïdes per produir TNF- α en determinades condicions experimentals (Sung SJ i col·l., 1988).

Un dels primers punts de control de l'expressió del TNF- α és el patró de metilació de la zona promotora. Aquest gen està altament metilat i presumiblement condensat en un estat heterocromàtic, i només és accessible a l'aparell transcripcional en alguns tipus cel·lulars. Aquesta accessibilitat del gen està controlada epigenèticament i es creu que pot ser la responsable en bona part de la distribució tissular de la producció de TNF- α .

S'ha observat que la transcripció del gen del TNF- α augmenta unes tres vegades després de l'exposició a LPS; l'expressió de l'RNA missatger (mRNA) augmenta des de

nivells quasi indetectables fins a representar el 0,1%-1% de l'mRNA cel·lular total, per la qual cosa el TNF- α arriba a ser una de les principals proteïnes produïdes pels macròfags activats (Mathews M, 1981).

Els glucocorticoides, capaços d'antagonitzar els efectes de l'endotoxina, si se subministren abans que aquesta, inhibeixen completament la síntesi de TNF- α en macròfags, disminueixen la quantitat d'mRNA produït en resposta a l'LPS i n'impedeixen la traducció. Cal destacar que aquesta inhibició no succeeix quan ja s'ha iniciat la inducció al nivell del sistema reticuloendotelial. Els nivells basals de glucocorticoides de les persones sanes probablement actuen evitant una alliberació incontrolada de TNF- α que, sense ells, podria tenir lloc en infeccions banals; és possible que la major susceptibilitat a les infeccions en malalts suprarenalectomitzats tingui relació amb la pèrdua d'aquest mecanisme de control.

El TNF- α és capaç d'induir *in vitro* l'alliberament d'IL-1, activitat que és potenciada per l'IFN- γ ; molt probablement l'IL-1 és capaç de modular algunes de les accions del TNF- α , a més a més, el patró d'activitats de l'IL-1 és particularment similar al del TNF- α , encara que, *in vitro*, és possible diferenciar quines activitats són degudes a l'IL-1 i quines al TNF- α .

L'IFN- γ , capaç d'activar els macròfags i augmentar l'activitat antitumoral, la producció d'H₂O₂, la capacitat fagocítica i altres funcions defensives, també augmenta la producció de TNF- α en resposta a l'administració d'endotoxina; aquesta funció sembla que està mitjançada tant per un augment al nivell transcripcional del gen, com al de la traducció una vegada s'ha sintetitzat l'mRNA del TNF- α . Els factors M-CSF (factor estimulador de les colònies de granulòcits i macròfags) també indueixen un augment de la producció de TNF- α quan són administrats abans que l'LPS.

Un dels estímuls més potents per a l'alliberació de TNF- α és l'LPS, tal com ja s'ha assenyalat anteriorment; també s'ha demostrat la capacitat inductora dels esters de forbol, de l'IL-2, així com d'una gran varietat d'estímuls infecciosos o inflamatoris com ara virus, certs microorganismes grampositius i alguns productes seus (com per exemple, la toxina-1 de la síndrome del xoc tòxic, enterotoxines estafilocòcciques B i exotoxina pirògena A d'estreptococs).

El TNF- α pot suprimir la seva pròpia producció. Aquest efecte és mitjançat pels seus receptors de membrana (TNFR-p55 i p75). S'ha observat que les cèl·lules de ratolins deficientes per als receptors TNFR-p55 i p75 produeixen més quantitat de TNF- α després de l'estimulació (Peschon JJ i col·l., 1998).

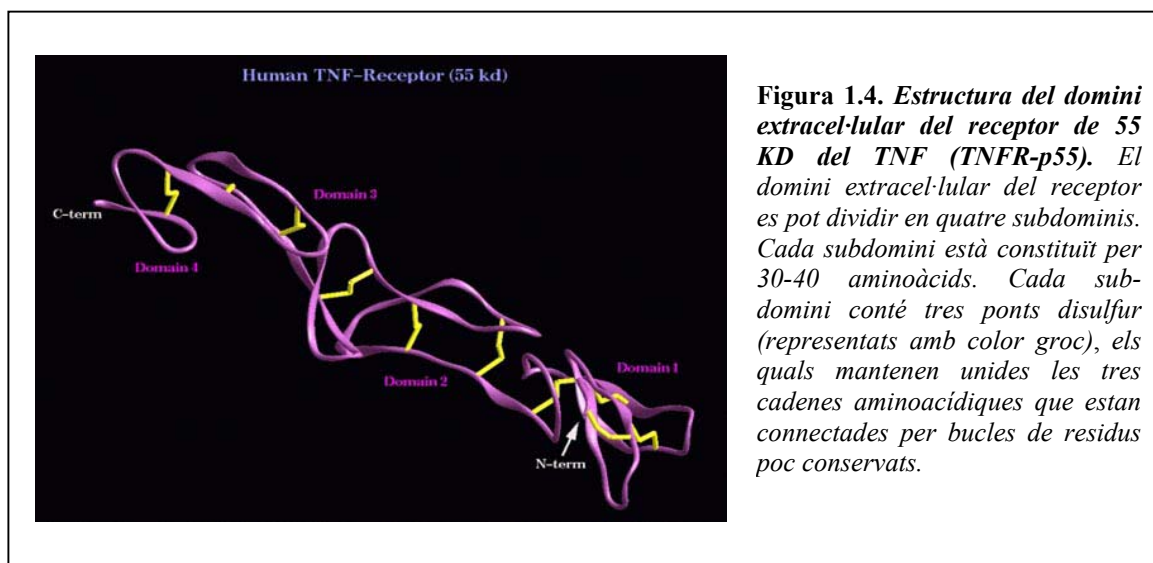
El control de la síntesi de TNF- α està regulada tant a escala transcripcional com postranscripcional (estabilitat de l'mRNA i eficàcia de la traducció) per la qual cosa la possibilitat d'una producció anòmala és mínima (Beutler B i col., 1986a). J. Han i col·laboradors (1990) van localitzar les seqüències responsables de la repressió de la traducció i de la inductibilitat de l'LPS en la zona compresa entre les bases 1197 i 1376 de la regió 3' no traduïda de l'mRNA del TNF- α . Aquesta regió conté una seqüència de residus d'adenina i uracil (AU) estructurada en forma de seqüències octamèriques repetides (UUAUUUAU)_n comuna a diversos mRNA de citocines i de protooncogens (Caput D i col·l., 1986; Greenberg M and Belasco JG, 1993; Krays V i col·l., 1989). És conegut que els elements rics en residus AU situats en la regió 3' no traduïda dels mRNA d'eucariotes són seqüències de reconeixement de diverses proteïnes d'unió a l'RNA i que actuen determinant l'estabilitat dels mRNA que la contenen ja que disminueixen la seva vida mitjana i, al mateix temps, inhibeixen la síntesi proteica d'aquestes molècules (Beutler B, 1990; Beutler B and Brown T, 1991).

1.2.3. Els receptors del TNF- α

Les activitats biològiques del TNF- α soluble, així com del TNF- α lligat a membrana, estan mitjançades per dos receptors estructuralment relacionats, però funcionalment diferents: el TNFR-p55 (CD120a, TNFR-I) i el TNFR-p75 (CD120b, TNFR-II) pertanyents a la família de proteïnes dels receptors del TNF (Smith C i col·l., 1990; Loetscher H i col·l., 1990; Schall T i col·l., 1990; Vandenabeele P i col·l., 1995). Tots els membres d'aquesta família són proteïnes transmembrana formades per dues subunitats idèntiques. La característica que defineix aquesta família de receptors és la presència en el domini extracel·lular d'unió a la proteïna de repeticions d'uns quaranta aminoàcids de mida, riques en residus de cisteïna.

El receptor del TNF- α de 55 KD és una molècula composta per 426 aminoàcids que comprèn un domini extracel·lular de 182 AA i un domini citoplasmàtic de 221 AA. El

receptor p75 està format per una seqüència de 439 AA, amb un domini extracel·lular de 235 AA i un domini intracel·lular de 174 AA. La constant de dissociació del TNFR-p55 i p75 pel TNF- α és aproximadament de 0,5 nM i 0,1 nM, respectivament. Els dominis extracel·lulars d'ambdós receptors comparteixen un 28% d'identitat, equivalent amb l'homologia que cadascun comparteix amb els altres membres d'aquesta família de proteïnes. D'altra banda, hi ha una completa absència d'homologia entre els dominis intracel·lulars d'ambdós receptors, o amb cap altra proteïna descrita fins al moment, cosa que suggereix que aquests receptors interaccionen amb proteïnes diferents i activen vies de transducció de senyals independents (Lewis M i col·l., 1991) (fig. 1.4).



Els dos receptors es coexpressen en la superfície de la majoria de tipus cel·lulars, encara que l'expressió del p55 i del p75 està controlada per mecanismes diferents. Típicament, el receptor p55 sembla que té una expressió ubiqua mentre que el receptor p75 es troba predominantment en cèl·lules hematopoètiques i endotelials.

Actualment, la funció específica de cada receptor és encara una qüestió en debat. S'han utilitzat nombroses estratègies de laboratori per atribuir funcions biològiques específiques als receptors p55 i p75 de membrana; els experiments utilitzant anticossos específics per a cada receptor (Shalaby MR i col·l., 1990; Sheehan K i col·l., 1995), lligands específics de receptor (Van Ostade X i col·l., 1993; Barbara JA i col·l., 1994) i ratolins genèticament deficients per a p55 o per a p75 (Rothe J i col·l., 1993; Pfeffer K i col·l., 1993; Erickson SL i col·l., 1994), han indicat que el receptor p55 és el principal receptor en la senyalització de la

majoria de les respostes inflamatòries clàssicament atribuïdes al TNF- α . La resposta cel·lular induïda per l'activació del receptor p55 abraça diferents aspectes de la immunologia. Aquest receptor controla els mecanismes de defensa en l'àmbit cel·lular, per exemple, induint la mort de les cèl·lules infectades per agents patògens. A escala orgànica, el p55 controla la defensa, coordinant el procés inflamatori i si parlem de tot l'organisme, induint canvis com ara la febre, l'astènia o augmentant la concentració de proteïnes sèriques de fase aguda. Per contra, sols s'ha identificat un nombre limitat d'activitats que el receptor p75 és, per si mateix, capaç d'induir. Aquestes respostes inclouen l'estimulació de la proliferació de timòcits i cèl·lules T, inducció de lesions necrotitzants en la pell i apoptosi de limfòcits T activats. (Shalaby MR i col·l., 1990; Tartaglia LA i col·l., 1993a; Zheng LX i col·l., 1995).

La idea que la senyalització del TNF- α succeeix principalment a través del receptor p55 va ser rebatuda per M. Grell i col·laboradors (1995), els quals van demostrar que la diversitat d'accions d'aquesta citocina prové d'una sensibilitat diferent d'ambdós receptors enfront de les formes soluble i transmembrana del TNF- α . Aquests autors van demostrar que el principal lligand per al receptor p55 és la forma secretada de 17 KD del TNF- α , mentre que la forma transmembrana de 26 KD és el principal activador del receptor p75. Aquesta idea vindria recolzada pel fet que la cinètica d'associació/dissociació del receptor p75 amb l'sTNF- α és molt ràpida; en canvi, la unió de l'mTNF- α amb el receptor p75, tal com succeeix durant el contacte cèl·lula-cèl·lula, permet la formació de complexos amb una major estabilitat i potencial senyalitzador. Addicionalment, el fet que l'mTNF- α sigui el principal activador de p75 suggereix que aquest receptor tindria un paper important en les respostes inflamatòries locals. Encara que actualment hi ha el consens general que l'mTNF- α és una molècula biològicament activa, la confirmació d'una senyalització preferencial a través del receptor p75 roman en controvèrsia. El mateix M. Grell i col·laboradors han demostrat que l'apoptosi en les cèl·lules endotelials després d'irradiació i d'endotoxèmia implica la participació de la forma transmembrana del TNF- α , això no obstant, pot ser bloquejada per inhibidors del receptor p55, però no del p75 (Eissner G i col·l., 1995).

D'altra banda, L.A. Tartaglia va proposar un model basant-se en l'observació que en condicions de baixes concentracions de TNF- α , els antagonistes del receptor p75 sols exercien una neutralització parcial de les funcions d'aquesta citocina. A concentracions

baixes, el TNF- α s'uneix preferentment al receptor p75 ja que l'afinitat del TNF- α és major pel receptor p75 que pel p55. Així doncs, si bé ambdós receptors assenyalen diferents activitats del TNF- α , en presència de concentracions baixes d'aquesta citocina, el receptor p75 tindria la funció de potenciar les respostes del receptor p55, reclutant el TNF- α i entregant-lo al receptor de menor afinitat, p55 (Tartaglia LA i col·l., 1993b). Recentment, però, s'ha demostrat que la potenciació de les respostes del receptor p55 pel p75 no implicaria un passi del lligant, sinó que més aviat involucraria el solapament de diferents successos en les vies de senyalització intracel·lular desencadenades per tots dos receptors (Weiss T i col·l., 1997).

Diversos estímuls inflamatoris desencadenen l'alliberació de receptor p55 i p75 solubles a la circulació a través d'un processament proteolític dels receptors de membrana (Carpenter A i col·l., 1995; Crowe PD i col·l., 1995). Els receptors solubles del TNF- α (sTNFR) poden tenir dues funcions diferenciades en l'organisme depenent de la seva concentració en el lloc d'acció del TNF- α , de la relació entre la seva concentració i la concentració local de TNF- α i de la ràtio d'eliminació del TNF- α i dels sTNFR. Per tant, els receptors solubles poden, en determinades situacions, funcionar com a antagonistes del TNF- α , capaços de neutralitzar l'activitat biològica d'aquesta citocina, en altres poden servir com a transportadors de TNF- α i fins i tot en certs casos podrien augmentar els efectes del TNF- α , perllongant la vida mitjana d'aquesta citocina o facilitant-ne la interacció amb els receptors de membrana. En els compartiments de l'organisme en els quals tant els sTNFRs com el TNF- α s'eliminen lentament (per exemple en els espais sinovials, en el líquid cefaloraquídi, els espais alveolars i peritoneals o en teixits inflamats on es produeix un bloqueig limfàtic), els sTNFRs actuen com a transportadors de la citocina i n'augmenten els seus efectes. En la circulació, on el TNF- α es degrada ràpidament ($t_{1/2} \sim 6'$), els receptors solubles actuen principalment com a inhibidors de les activitats del TNF- α , especialment quan aquests estan presents en relativament altes concentracions (Aderka D i col·l., 1992). Els receptors solubles poden competir pel TNF- α amb els receptors de superfície cel·lular i consegüentment bloquejar la seva biodisponibilitat i servir com a inhibidors fisiològics del TNF- α . A més, el clivatge dels receptors del TNF- α redueix la resposta cel·lular al TNF- α com a conseqüència d'una reducció en la senyalització intracel·lular. El paper inhibidor dels receptors solubles estaria recolzat pel fet que l'administració exògena de molècules recombinants de p55 o p75 solubles són efectius

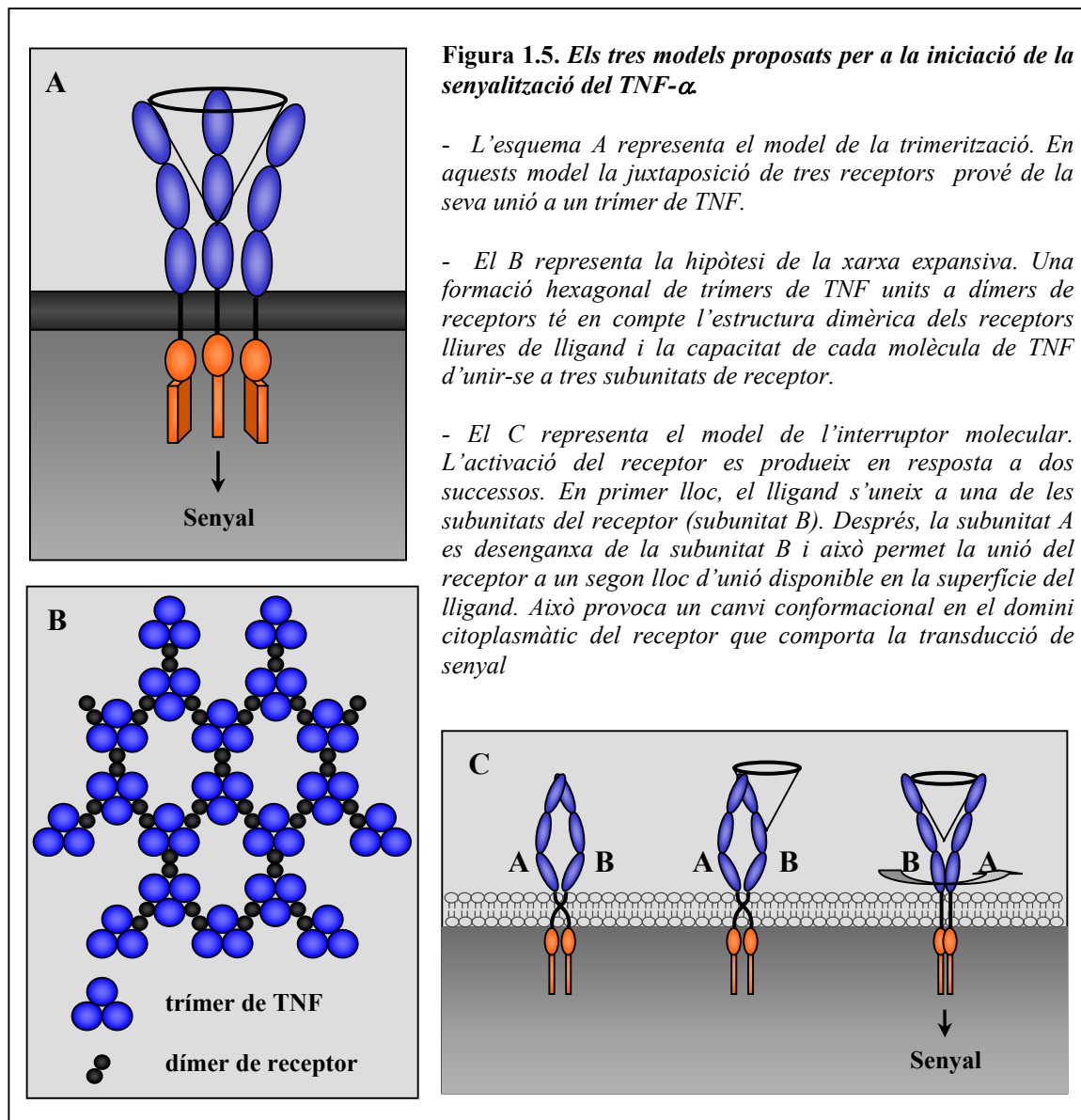
com a antagonistes del TNF- α en diferents models d'inflamació, on es coneix la participació d'aquesta citocina (Lesslauer W i col·l., 1991; Ashkenazi A i col·l., 1991; Wooley PH i col·l., 1993).

1.2.4. Transducció de senyal

El TNF- α exerceix el seu efecte a través dels seus dos receptors presents en la membrana plasmàtica de les cèl·lules diana, unint-s'hi de forma reversible i amb una elevada afinitat. Aquesta unió desencadena una sèrie de processos bioquímics que es coneixen com a transducció de senyals i que culminen amb l'expressió de gens específics, els productes dels quals determinen la resposta o fenotip cel·lular.

1.2.4.1. Iniciació de la senyalització

Hi ha tres models diferents que intenten explicar com es produeix l'activació dels receptors després de la unió del TNF- α . Segons el model de la trimerització (fig. 1.5A), cada trimer de TNF- α s'uneix a tres receptors, el complex resultant genera un senyal d'activació intracel·lular. Aquest model està recolzat per l'estructura cristal·logràfica de la limfotoxina- α , en la qual s'ha observat que tres fragments del receptor p55 cristal·litzen amb cada trimer de limfotoxina- α (Baner DW i col·l., 1993). El model de la *xarxa expansiva* (fig. 1.5B) té en compte l'estructura dimèrica dels receptors del TNF- α quan no estan units al seu lligand i la capacitat de cada molècula de TNF- α per unir-se a tres subunitats de receptor. La conformació dimèrica dels receptors pot permetre una disposició hexagonal de les molècules dimèriques dels receptors i les del lligand trimèriques, la qual cosa pot generar senyals gràcies als contactes que s'estableixen entre els dominis citoplasmàtics dels receptors. El model, però, més acceptat actualment és el de l'*interruptor molecular* (fig. 1.5C). En aquest model cada dímer de receptor és una unitat activable que experimenta reordenaments després de la unió del lligand trimèric (Bazzoni F i col·l., 1995). Els dominis intracel·lulars dels receptors del TNF- α estan desproveïts d'activitat enzimàtica intrínseca. S'ha determinat que aquests receptors transdueixen el senyal mitjançant el reclutament de proteïnes citosòliques amb activitat enzimàtica.



1.2.4.2. Proteïnes adaptadores

El reclutament dels enzims citosòlics de senyalització cap als receptors del TNF- α es realitza a través de les proteïnes adaptadores, la majoria de les quals no tenen activitat enzimàtica. Les proteïnes adaptadores, igual que els lligands i els receptors, tenen una estructura modular. Algunes d'aquestes proteïnes poden unir-se entre si gràcies a mòduls específics diferents dels que participen en la unió amb les molècules de senyalització.

El resultat és la formació d'una xarxa de proteïnes la qual determinarà la resposta cel·lular final a través de la unió de diferents enzims. Aquesta xarxa està composta per dues parts principals, cadascuna de les quals involucra un motiu d'unió proteic diferent.

Una part inclou diferents proteïnes adaptadores com ara MORT/FADD, TRADD, RIP i RAIDD/CRADD, les quals s'uneixen entre si i amb el receptor p55 mitjançant un motiu DD (*death domain*) que es troba tant en les proteïnes adaptadores com en el receptor p55. L'altra part està formada per un grup de molècules adaptadores i de receptors com per exemple el p75, CD40, etc. que comparteixen un motiu d'unió proteic anomenat domini TRAF (*TNF receptor-associated factor*). Totes dues parts de la xarxa s'uneixen gràcies a l'associació del domini TRAF de la proteïna adaptadora TRAF2 amb regions específiques de les proteïnes adaptadores TRADD i RIP.

Les funcions d'aquestes dues parts de la xarxa de proteïnes adaptadores no estan encara ben diferenciades. Les proteïnes adaptadores que contenen un domini DD participen principalment en la inducció de mort cel·lular mentre que les proteïnes amb un domini TRAF estan involucrades en la regulació gènica. Aquestes vies de transducció de senyal s'expliquen a continuació de forma més detallada.

1.2.4.3. Activació gènica per transducció de senyals proinflamatoris i antiapoptòtics del TNF- α

Els dos principals factors de transcripció activats pel TNF- α són el factor nuclear κ B (NF- κ B) i la proteïna activadora 1 (AP-1). El NF- κ B pertany a la família Rel de factors activadors de la transcripció, la seva forma activa és un heterodímer normalment constituït per dues proteïnes: una subunitat p65 (també anomenada relA) i una subunitat p50. En condicions basals, l'NF- κ B es troba en el citosol complexat amb els seus inhibidors: l'I κ B α i l'I κ B β (Baldwin AS, 1996). El TNF- α indueix la fosforilació dels I κ B pel complex quinasa I κ B la qual cosa en causa la seva degradació. L'NF- κ B lliure es transloca cap al nucli on activa diferents gens que presenten seqüències d'unió κ B en la regió promotora (Baeuerle PA, 1998).

L'AP-1 és un membre de la família d'activadors de la transcripció que presenten una regió de cremallera de leucines. Normalment, l'AP-1 està format per un homodímer o heterodímer de Jun, Fos i membres de la família de factors de transcripció ATF (Karin M i col·l., 1997). L'activitat de l'AP-1 està regulada per la inducció i fosforilació dels dominis transactivadors amino terminals dels seus components per l'acció de proteïnes de la família

de les MAP quinases: ERK1/2, JNK/SAPK i la quinasa p38. El TNF- α és un dels diferents estímuls que poden iniciar aquesta cascada de quinases (Eder J, 1998).

En els darrers anys s'ha anat perfilant el mecanisme pel qual el receptor TNFR-p55 activa aquesta via de senyalització. La cua intracel·lular del TNFR-p55 conté un domini DD d'uns 80 residus que permet la interacció amb altres proteïnes que també contenen aquest domini. La primera molècula identificada com a proteïna d'unió al receptor TNFR-p55 va ser l'anomenada proteïna TRADD (*TNF receptor-associated death domain*). Aquesta proteïna s'aparella amb el receptor p55 donant lloc a l'activació de la transcripció de gens o bé a la inducció de mort cel·lular (Hsu H i col·l., 1996b). En estat basal, el receptor TNFR-p55 està associat a una proteïna inhibidora, anomenada SODD (*silencer of death domains*) a través dels seus DD. Després de la unió del TNF- α al receptor p55, el SODD es dissocia ràpidament i permet que TRADD s'uneixi a través de la mateixa regió (Jiang Y i col·l., 1999).

Posteriorment, el complex TNFR-p55/TRADD recluta dues proteïnes: TRAF2 (primerament identificada com a proteïna d'unió al receptor TNFR-p75) i una proteïna que pertany a la família de les serin/treonin quinases amb DD, anomenada RIP (*receptor interacting protein*) (Arch RH i col·l., 1998). Aquestes proteïnes es caracteritzen per la presència d'un domini TRAF que és necessari per a les interaccions proteïna-proteïna.

S'han caracteritzat diverses molècules que presumiblement podrien ser el vincle de RIP i TRAF2 amb NF- κ B i JNK/SAPK, respectivament. La proteïna quinasa NIK (NF- κ B-inducing kinase) és el nexa més probable entre RIP i la quinasa I κ B (Lin X i col·l., 1998; Malinin NL i col·l., 1997). NIK pertany a la família de les MAP quinases que també inclou altres proteïnes com ara c-Raf (que inicia la cascada que porta a l'activació d'ERK1/2) i MEKK-1 (la qual inicia una cascada de quinases paral·lela que resulta amb l'activació de JNK/SAPK i la quinasa p38) (Eder J, 1997; Robinson MJ and Cobb MH, 1997). Addicionalment, s'han proposat dues molècules que lliguen a TRAF2 amb la cascada de quinases que donen lloc a l'activació de JNK/SAPK i p38, aquestes proteïnes són l'ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) i la GCKs (*germinal center kinase*) (Shi C-S and Kehrl JH, 1997; Yuasa T i col·l., 1998). Aquestes molècules, però, no estan involucrades a l'hora d'acoblar el TNF- α amb el tercer component del sistema AP-1, l'ERK1/2; sembla que el nexa en aquest cas correspondria a la proteïna *MAP kinase-activating death domain* (Schievella AR i col·l., 1997).

Tal com s'ha assenyalat, el NF- κ B i l'AP-1 són moduladors importants dels efectes proinflamatoris del TNF- α . Tanmateix, s'ha descrit recentment una proteïna anomenada CARDIAK (Inohara N i col·l., 1998), homòloga de RIP, la qual s'associa amb el complex TNFR-p55/TRADD/TRAF2 i interacciona amb la procaspasa 1, amb la qual cosa es produeix el clivatge i l'activació de la caspasa 1 (McCarthy JV i col·l., 1998; Thome M i col·l., 1998). Això podria constituir un mecanisme addicional de transducció de les respostes proinflamatòries del TNF- α , independent de NF- κ B i d'AP-1.

El domini intracel·lular del receptor TNFR-p75 uneix un heterocomplex de membres de la família TRAF: TRAF1 i 2. Adicionalment, les molècules cIAP1 i 2 també formen part d'aquest complex (Clem RJ and Duckett CS, 1997; Rothe M i col·l., 1995; Shu H-B i col·l., 1996). No es coneix encara com aquestes proteïnes actuen de forma antiapoptòtica, no obstant això, sembla que podrien inhibir directament algunes caspases o bé d'alguna manera pertorbar el senyal proapoptòtic del TNF- α (Fig. 1.6).

1.2.4.4. Mort cel·lular induïda pel TNF- α

Les cèl·lules tractades amb TNF- α poden morir per apoptosi o per necrosi, depenent d'algunes variables com el tipus cel·lular, la dosi i les condicions de l'exposició. El receptor TNFR-p55 és el principal responsable de la transducció del senyal de mort, funció, aquesta, comuna als altres membres de la subfamília de receptors del TNF- α amb DD (Ashkenazi A and Dixit VM, 1998). Tanmateix sota certes condicions el receptor TNFR-p75 pot potenciar el senyal de mort del receptor p55 o fins i tot, mitjançar l'apoptosi de forma independent (Declercq W i col·l., 1998; Haridas V i col·l., 1998; Weiss T i col·l., 1998). El mecanisme pel qual el TNFR-p75 indueix la mort cel·lular encara no ha estat caracteritzat.

Actualment està ben establert que la inducció d'apoptosi pel TNF- α involucra una família de proteases: les caspases. Les caspases existeixen en la cèl·lula en forma de precursors inactius els quals són clivats i activats després d'un estímul apoptòtic (Cory S, 1998; Salvesen GS and Dixit VM, 1997). El clivatge i la subsegüent activació de les caspases es produeix de forma autocatalítica o bé com a resultat del clivatge per part d'altres caspases. Aquesta família de proteases s'han classificat en dos subgrups, el primer correspon a les caspases que actuen com a iniciadors del senyal de mort procedent dels receptors de la superfície cel·lular; el segon subgrup inclou les caspases considerades com les executores

de l'apoptosi. S'ha establert l'existència de diferents mecanismes d'activació de les caspases iniciadores després de l'estimulació del receptor p55. La ruta d'activació millor caracteritzada és la que recluta la proteïna FADD (*Fas-associated death domain*) a través del TRADD. FADD i TRADD interaccionen per mitjà dels seus DD. La molècula de FADD s'uneix a dues procaspases iniciadores: la caspasa-8 i -10. L'agregació d'aquestes procaspases al complex condueix al seu clivatge autocatalític i a la seva activació (Vincenz C and Dixit VM, 1997; Yuan J, 1997). D'una manera anàloga, la proteïna TRADD també pot interactuar amb la proteïna homòloga de CED3 associada a RIP, la qual posteriorment recluta i activa la procaspasa-2 (Duan R and Dixit VM, 1997). Encara no està clar si una d'aquestes rutes és sempre predominant o si hi ha especificitat cel·lular o tissular, tal com s'ha observat per a les caspases executores (Kuida K i col·l., 1998; Woo M i col·l., 1998) (Fig. 1.6).

Els mecanismes pels quals les caspases iniciadores, com ara la caspasa-8, -10 i -2, activen les caspases executores és avui dia una matèria en debat. El paper del mitocondri en la mort cel·lular induïda pel TNF- α i com un senyal pot ser transmès des dels receptors de la superfície cel·lular al mitocondri es discutiran posteriorment.

1.2.4.5. Paper de les esfingomielinases en la senyalització del TNF- α

El TNF- α , per mitjà del receptor TNFR-p55, activa a dues esfingomielinases, l'esfingomielinasa neutral de membrana (NSM) i l'esfingomielinasa àcida endosomal/lisosomal (ASM). La proteïna FAN que s'uneix al receptor TNFR-p55 formant un complex amb l'NSM, sembla que és essencial per a l'activació de NSM. Per contra, l'activació d'ASM es produeix per la via del TRADD/FADD (Adam-Klages S i col·l., 1998). L'activació de les esfingomielinases resulta en la hidròlisi de l'esfingomielina per generar ceramida, un segon missatger amb potencials efectes en l'apoptosi i en l'activació del NF- κ B (Hannun YA, 1994). Petites quantitats de ceramida exògena poden potenciar la mort cel·lular induïda pel TNF- α . D'altra banda, ni l'NSM ni l'ASM sembla que participin en l'activació d'NF- κ B ni de JNK/SAPK induïda pel TNF- α (Zumbansen M and Stoffel W, 1997). Els experiments utilitzant ratolins *knockout* per ASM han mostrat que l'ASM és essencial per a alguns inductors de l'apoptosi com per exemple les radiacions ionitzants, però, no per altres, com Fas (Santana P i col·l., 1996). En canvi, encara no s'ha pogut demostrar la capacitat del TNF- α per induir apoptosi en absència d'ASM. S'ha proposat que l'NSM estaria

hi ha el TNF- α . Aquest fet sol produir-se després de la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial i representa un compromís irreversible de mort cel·lular (Bradham CA i col·l., 1998; Reed JC, 1997). El TNF- α també indueix la generació d'intermediaris d'oxigen reactius, que estan associats a la mort per necrosi (Goossens V i col·l., 1995). Les bases de la diferència entre mort per necrosi o per apoptosi en resposta al TNF- α no es coneix. El TNF- α produeix l'inflament dels mitocondris i això pot estar mitjançat tant pel receptor p55 com pel p75.

Les bases moleculars d'aquests canvis comencen ara a ser elucidades. Després del tractament amb TNF- α , la caspasa-8 activada talla directament les molècules de Bid (un membre proapoptòtic de la família del Bcl-2). El fragment C-terminal resultant es transloca cap al mitocondri on indueix l'alliberació de les proteïnes de l'espai intermembrana, incloent-hi el citocrom c i el factor inductor d'apoptosi (Luo X i col·l., 1998) (fig. 1.6). No obstant això, aquest mecanisme és tan sols un dels efectes que el TNF- α exerceix en el mitocondri; és probable que hi hagi altres vies de senyalització, encara no caracteritzades, entre els receptors p55, p75 i el mitocondri.

1.3. Activitats biològiques del TNF- α

De totes les citocines, el TNF- α , juntament amb l'IL-1, és la que exhibeix l'espectre més ampli d'activitats pleiotròpiques. La quantitat de treballs publicats sobre les funcions del TNF- α en cultius cel·lulars, teixits, en animals i en humans és tan extensa que qualsevol esforç per a revisar-la està gairebé condemnat al fracàs. A més a més, l'expressió quasi ubiqüa dels receptors del TNF- α , la producció de TNF- α per diferents tipus cel·lulars sota una àmplia varietat de condicions immunològiques i inflamatòries i les complexes interaccions entre els nombrosos membres de la família del TNF- α compliquen les temptatives de definir de forma precisa la funció fisiològica d'aquesta citocina. És per aquest motiu que en aquest apartat es presenta una visió general de les principals funcions clàssicament atribuïdes al TNF- α . Posteriorment ens centrarem en el paper que aquesta citocina desenvolupa en els temes més relacionats amb aquest treball: el desencadenament del part i la sèpsia neonatal.

Actualment hi ha el consens general que el TNF- α és un mitjancer clau de la inflamació com a resposta de l'hoste al dany o a la invasió de microorganismes patògens i paràsits. És poc probable que existeixi cap òrgan que no pugui estar afectat pel TNF- α . Aquesta citocina produeix marcats canvis en el cor, els pulmons, el sistema nerviós central, el fetge, els ronyons, l'intestí, etc. A més a més, al TNF- α se l'ha implicat en la patogènia de moltes malalties, algunes de les quals es relacionen en la taula annexa.

Taula 1.3. Resum dels efectes biològics i d'algunes malalties en les quals participa el TNF- α

Efectes biològics			
<i>Sistema nerviós central:</i>	Febre Anorèxia Alteració de la secreció d'hormones pituitàries	<i>Pulmonar:</i>	Edema Hipòxia Síndrome del destret respiratori de l'adult
<i>Cardiovascular:</i>	Xoc Supressió miocàrdica Síndrome de la filtració capil·lar Síntesi d'òxid nítric	<i>Gastrointestinal:</i>	Necrosi Diarrea Síntesi hepàtica de proteïnes de fase aguda
<i>Renal:</i>	Necrosi dels túbuls renals Diüresi seguida de fracàs renal agut oligúric	<i>Endocrí:</i>	Acidosis làctica Hiperaminoacidèmia Hiperglicèmia seguida d'hipoglicèmia

Hematopoètic:	<p>Neutropènia</p> <p>Inhibició de l'eritropoesi i increment de la destrucció d'eritròcits</p> <p>Coagulació intravascular disseminada</p>
Malalties	
<p>SIDA</p> <p>Anèmia</p> <p>Malària cerebral</p> <p>Hepatitis</p> <p>Resistència a la insulina</p> <p>Linfoma</p> <p>Esclerosi múltiple</p> <p>Obesitat</p> <p>Trauma</p> <p>Coagulopatia intravascular disseminada</p> <p>Malalties autoimmunes (diabetis, artritis reumatoide)</p>	<p>Caquèxia</p> <p>Càncer</p> <p>Xoc hemorràgic</p> <p>Lepra</p> <p>Leucèmia</p> <p>Meningitis</p> <p>Isquèmia miocardiaca</p> <p>Xoc sèptic</p> <p>Tuberculosi</p> <p>Rebuig d'òrgans trasplantats</p>

La importància biològica del TNF- α es correlaciona amb la magnitud de la seva expressió *in vivo*. Així, per exemple, a concentracions localment produïdes, el TNF- α pot ser fonamental en el manteniment de l'homeòstasi fisiològica. A aquests nivells baixos el TNF- α pot regular diferents processos fisiològics com per exemple el ritme circadià de la temperatura corporal, la son i l'apetit (Kunkel SL i col·l., 1989). A mesura que la concentració de TNF- α incrementa en resposta a un dany local, es creu que aquest mitjancer inflamatori té un paper crític en l'activació cel·lular i la propagació de la resposta inflamatòria. La presència de TNF- α sota aquestes circumstàncies orquestra un procés inflamatori localitzat i exerceix efectes tant autocrins com paracrins en les cèl·lules circumdants. En aquest context, la funció principal del TNF- α secretat o del TNF- α transmembrana (mTNF) seria la iniciació, el manteniment i la resolució de la inflamació local.

La troballa de concentracions elevades de TNF- α *in vivo* durant el curs de diferents malalties ha generat un gran interès en diverses àrees de la recerca biomèdica, ja que aquest increment sembla que es correlaciona amb la fisiopatologia de la malaltia (Larrick JW i col·l., 1988; Tracy KJ i col·l., 1988; Beutler B i col·l., 1986b; Sherry B i col·l., 1988). Algunes respostes inflamatòries cròniques s'esdevenen mitjançant una cascada d'alliberació de citocines

necessàries per promoure les interaccions cel·lulars que culminen en una resposta immunològica. Sovint, aquestes citocines assoleixen concentracions suficientment elevades per escapar de la zona d'inflamació local, passant a la circulació sistèmica. La presència de citocines circulant sistèmicament causa activació de les cèl·lules immunològiques i una alteració significativa de la fisiologia de l'hoste. L'exagerada producció de TNF- α sota aquestes condicions pot resultar en un procés fisiopatològic, amb la generació dels símptomes associats a la malaltia. Finalment, aquesta producció exagerada i descontrolada de TNF- α s'ha associat amb una alta morbiditat i mortalitat on possiblement, l'exemple més estudiat d'aquesta situació de risc vital sigui el paper del TNF- α en la mediació de la sèpsia i del fracàs multiorgànic. Aquest procés devastador és un exemple de desregulació de les citocines, aquesta desregulació sovint no respon al tractament convencional, cosa que comporta la mort de l'hoste.

En resum, els efectes del TNF- α estan, doncs, polaritzats en beneficiosos i perjudicials depenent d'un complex conjunt de factors que inclou el grau d'exposició de les cèl·lules diana al TNF- α lliure, el temps d'exposició i la presència en el medi d'altres citocines amb les quals el TN- α estableix una complicada xarxa d'interaccions. Algunes activitats se solapen, diverses combinacions de citocines poden incrementar o disminuir els efectes biològics, interaccionant freqüentment per estimular o inhibir la biosíntesi de citocines. Un dels principals efectes del TNF- α és estimular l'alliberació d'altres citocines que amplifiquen i estenen les activitats biològiques del TNF- α (taula 1.4). Una vegada iniciada, aquesta cascada de factors dirigiran la resposta de l'hoste a la infecció o al dany i persistirà durant hores o dies, dissociant-se relativament en el temps de l'estímul inicial.

Taula 1.4. Resum de les interaccions del TNF- α amb altres citocines

▪ Citocines induïdes pel TNF:	IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , GM-CSF, NGF, TGF- β , PDGF
▪ Citocines que suprimeixen els efectes del TNF:	TGF- β , IL-10, sTNFRs
▪ Citocines que potencien els efectes del TNF:	IL-1, IFN- γ , LIF

1.4. El TNF- α en les infeccions perinatals

1.4.1. Les infeccions intrauterines

Les infeccions bacterianes intrauterines es poden donar entre els teixits materns i les membranes fetals (p. ex. en l'espai coriodecidual), a les membranes fetals (amni i cori), la placenta, el líquid amniòtic, el cordó umbilical o el fetus. Les infeccions de les membranes fetals, identificades histològicament, s'anomenen corioamnionitis; les infeccions del cordó umbilical s'anomenen funisitis; les infeccions del líquid amniòtic, amnionitis i, finalment, les infeccions de la placenta s'anomenen villitis; aquestes, però, solen ser poc freqüents. Actualment s'utilitza de forma genèrica el terme corioamnionitis per designar un quadre clínic febril degut a la infecció de les estructures fetals entenent com a tals la placenta, el cordó umbilical, el líquid amniòtic i la decídua. La inflamació de qualsevol d'aquestes estructures comporta una patogènia i una clínica comuna, i si bé hi pot haver algunes diferències anatòmiques o clíniques depenent de l'estructura més afectada, aquestes es consideren variants d'una mateixa síndrome: la corioamnionitis aguda.

1.4.1.1. La corioamnionitis aguda

Aquest nom s'aplica a l'aparició de febre alta, de més de 38°C, durant la gestació (especialment si s'acompanya de ruptura prematura de membranes), durant el part o bé, en el puerperi immediatament anterior a les 48 hores. Aquest límit assenyala el final de la corioamnionitis i el començament de la infecció puerperal.

Per definir la corioamnionitis, a més a més de la febre, cal que coexisteixin almenys dos dels símptomes següents: taquicàrdia materna, dolor abdominal, úter endurit o amb contraccions, líquid amniòtic purulent o meconial, leucocitosi o altres proves de laboratori positives i taquicàrdia fetal.

▪ Etiopatogènia

Els bacteris poden envair l'úter per migració des de la cavitat abdominal a través de les trompes de Fal·lopi, per contaminació de les agulles utilitzades en les amniocentesis, per via hematològica a través de la placenta o per ascens des de la vagina.

Clàssicament s'ha acceptat que els microorganismes vaginals podrien ascendir i colonitzar en primer lloc l'espai coriodecidual; en alguns casos, posteriorment, travessen les membranes coriòniques cap al líquid amniòtic i alguns fetus poden esdevenir finalment infectats (Romero R, and Mazor M, 1988). Les evidències d'infecció per aquesta ruta provenen d'un estudi en 609 dones a qui se'ls va practicar cesària abans de la ruptura de membranes. La meitat de les 121 dones amb cultius positius de membranes tenien també un cultiu positiu del líquid amniòtic i generalment, en ambdós casos el microorganisme aïllat era el mateix. Un percentatge menor de fetus va presentar un cultiu de líquid cefaloraquidi o un hemocultiu positiu al naixement (Cassell G i col·l., 1993).

La corioamnionitis sol tenir una etapa subclínica o asimptomàtica, que pot progressar a una corioamnionitis aguda si les condicions per què prosperin els gèrmens són favorables. En cas contrari, la corioamnionitis no passarà de l'etapa subclínica, això no obstant, des d'aquí també poden produir-se complicacions de gran importància obstètrica.

D'altra banda, se sap que la corioamnionitis aguda s'associa a una sèrie de factors predisponents, com són ara: a) nivell socioeconòmic baix; b) tabaquisme; c) incompetència cervical; d) l'existència d'un augment de la pressió intraamniòtica (p. ex. polihidramni); i e) després d'intervencions quirúrgiques com el cerclatge. El factor desencadenant és sempre la inoculació de microorganismes patògens en les diferents estructures fetals, la qual cosa estaria afavorida per la presència dels factors de risc abans esmentats.

▪ **Microorganismes implicats**

En dones amb parts prematurs espontanis i membranes íntegres, els bacteris més comunament aïllats són *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis* i peptostreptococ, tots ells organismes vaginals de relativa baixa virulència (Andrews W i col·l., 1995; Gibbs RS i col·l., 1992). Els organismes sovint associats amb infeccions del tracte vaginal en dones no embarassades, com ara *Neisseria gonorrhoeae* i *Chlamydia trachomatis*, es troben rarament en l'úter abans de la ruptura de membranes, mentre que els més freqüentment associats a corioamnionitis i infecció fetal després de la ruptura de membranes (*Streptococcus agalactiae* i *Escherichia coli*) es troben només de forma ocasional. La majoria dels bacteris que es troben a l'úter associats amb part prematur són, per tant, d'origen vaginal, mentre que els organismes que no pertanyen al tracte genital rarament es poden associar amb corioamnionitis o amb part prematur. Encara que no s'ha

estudiat de forma extensa, sembla que les infeccions víriques intrauterines no són una causa comuna del desencadenament del part preterme (Wenstrom KD i col·l., 1998).

▪ **Vaginosi bacteriana**

Les dones amb vaginosi bacteriana, definida com un descens de la flora normal de lactobacils (*Lactobacillus sp*) i un increment massiu d'altres organismes com per exemple *G. vaginalis*, *mobiluncus*, *U. urealyticum* i *M. hominis*, tenen el doble de risc de patir parts prematurs espontanis (Hillier SL i col·l., 1995; Meis PJ i col·l., 1995; Holst E i col·l., 1994). Actualment, no es coneix com la vaginosi bacteriana (en absència d'infecció ascendent cap a l'úter) o infeccions com la periodontitis i infeccions del tracte urinari poden desencadenar el part. Una explicació possible seria l'activació d'una resposta inflamatòria local mitjançada per citocines i endotoxines que a través de la sang podria afectar a l'úter. D'altra banda, també s'ha assenyalat que la vaginosi bacteriana podria representar un marcador de colonització intrauterina per als mateixos microorganismes (Hillier SL i col·l., 1994).

▪ **Diagnòstic de les infeccions intrauterines**

Les infeccions intrauterines són sovint cròniques i asimptomàtiques fins que comença el part o es produeix el trencament de les membranes. Fins i tot durant el part, la majoria de dones a les quals posteriorment se'ls ha diagnosticat corioamnionitis (per anàlisi histològica o per cultiu) no presenten cap altre símptoma que el part prematur. En el cas de les corioamnionitis agudes el diagnòstic pot ser clínic, basat en els símptomes o de certesa basat en el resultat del cultiu bacteriològic del líquid amniòtic o en l'anàlisi histològica.

El problema que sorgeix habitualment és que el diagnòstic basat en els cultius bacteriològics retarda els resultats de 24 a 78 hores. Aquest temps perdut pot resultar fatal tant per al fetus com per a la mare ja que la corioamnionitis, igual que la ruptura prematura de membranes, incrementa el risc de mortalitat i morbiditat fetal, que anirà augmentant a mesura que transcorre el temps des de l'inici de la infecció i que pot donar lloc a una sèpsia neonatal en el pitjor dels casos (Garite TJ and Freeman RK, 1982; Morales WJ, 1987). D'igual manera, hi ha un risc matern de presentar una infecció generalitzada si el diagnòstic es retarda massa, o el que és més freqüent, si es presenten problemes infecciosos postpart com

per exemple l'endometritis, que en alguns casos pot comportar conseqüències negatives en vistes a una posterior gestació.

El diagnòstic clínic de la corioamnionitis és sempre de sospita ja que els símptomes i la clínica que l'acompanyen són inespecífics. El problema en aquest cas és que no tots els criteris que defineixen la corioamnionitis clínica (vegeu l'apartat 1.4.1.1) es troben en tots els casos, i moltes vegades no són fàcils d'interpretar ja que el mateix tractament que s'administra pot alterar-los o pot retardar-ne l'aparició. Per exemple, els beta-mimètics provoquen generalment taquicàrdia fetal i l'administració de corticoides per madurar el fetus pot causar leucocitosi materna reactiva.

Diferents autors han afirmat que els criteris per al diagnòstic de la corioamnionitis són poc sensibles. R. Romero i col·laboradors, 1989a, va trobar sols un 12,5% de pacients, amb cultiu positiu de líquid amniòtic, que presentaven signes clínics d'infecció intrauterina. També, Guzick DS i Win K, 1985, van observar que sols un petit percentatge de les pacients amb corioamnionitis histològica presentaven signes d'infecció. La conclusió d'aquest estudi és que la corioamnionitis subclínica és una important causa de part prematur.

1.4.1.2. Infeccions neonatals adquirides durant el part

El fetus està protegit de la flora microbiana present en el tracte genital de la mare. La colonització del fetus i de la placenta normalment succeeix després de la ruptura de les membranes fetals. Si el part es retarda després de la ruptura, la flora vaginal pot ascendir i en alguns casos afectar les membranes fetals, placenta, cordó umbilical, etc. La infecció fetal també pot produir-se com a conseqüència de l'aspiració de líquid amniòtic infectat. Si el part s'esdevé en un interval curt després de la ruptura de membranes, el neonat es pot colonitzar durant el pas pel canal del part.

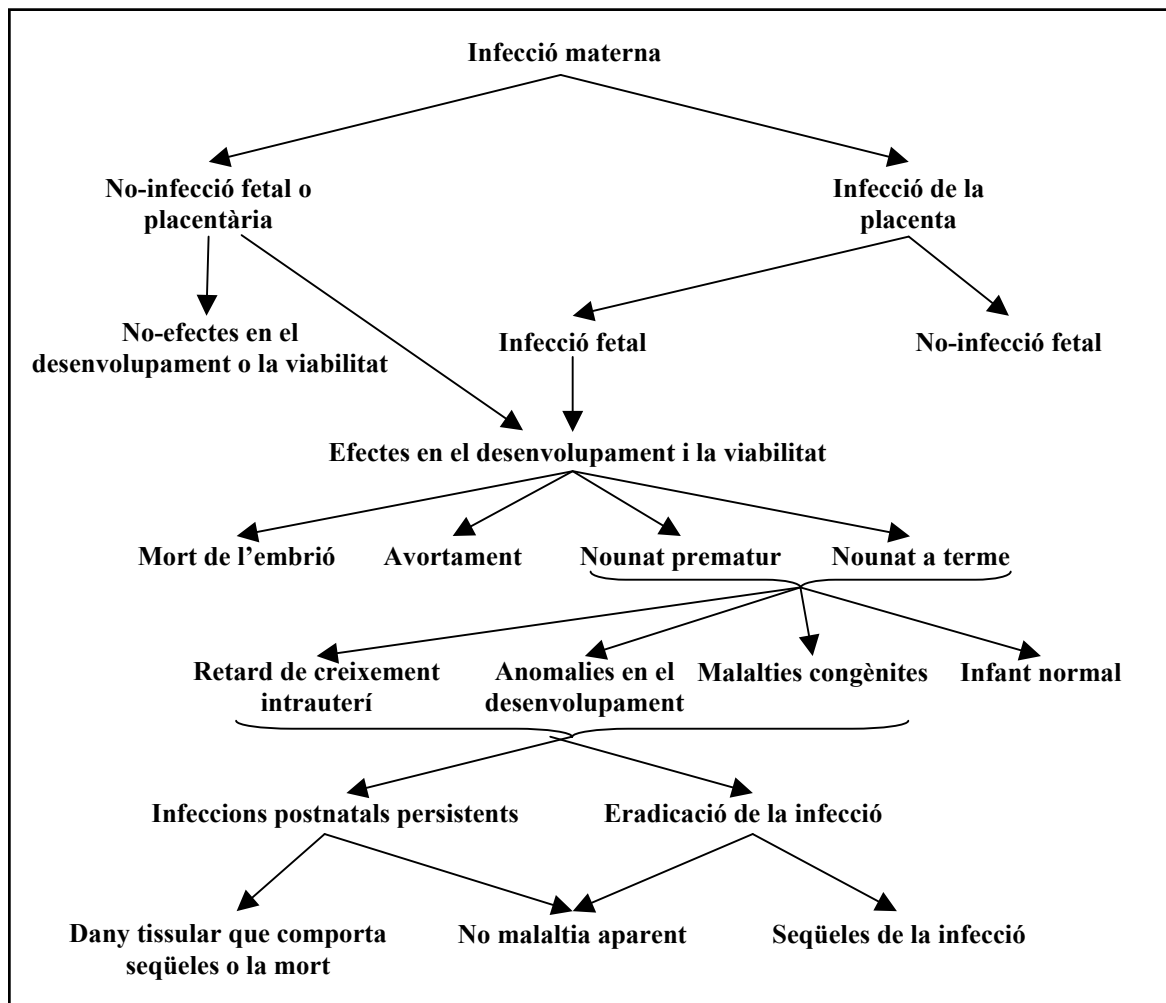
1.4.1.3. Conseqüències de les infeccions intrauterines

Els resultats d'una infecció de les estructures fetals o del mateix fetus inclouen la mort de l'embrió, l'avortament, la ruptura prematura de les membranes fetals i el part prematur o a terme d'un infant que pot ser normal o no. Els efectes d'una infecció fetal poden aparèixer en el nadó en forma de baix pes de naixement (com a conseqüència d'un retard de creixement intrauterí), anomalies en el desenvolupament o malalties congènites.

Les infeccions adquirides durant el naixement poden donar lloc a malalties sistèmiques greus que comporten la mort o infeccions postnatales persistents. Tant les infeccions intrauterines com les adquirides durant el part poden persistir després del naixement i causar anomalies en el creixement i en el desenvolupament que poden ser aparents ja al naixement o no ser reconegudes fins al cap de mesos o bé d'anys.

D'altra banda, nombroses malalties bacterianes en dones embarassades (com per exemple la febre tifoide, la pneumònia, la sèpsia o infeccions del tracte urinari) poden afectar el fetus sense que es produeixi una invasió microbiana dels teixits fetals. De forma similar, infeccions per protozous com la malària o infeccions víriques com ara la varicel·la, la verola o el xarampió poden afectar també el fetus. La febre, l'anòxia, les toxines circulants o alteracions metabòliques en la mare durant aquestes infeccions poden afectar l'embaràs donant com a possibles resultats l'avortament o el part prematur entre els més probables.

Figura 1.7. Principals conseqüències de les infeccions intrauterines.



1.4.2. La ruptura prematura de membranes

Les membranes que envolten la cavitat amniòtica estan constituïdes per l'amni i el cori; són capes adherents consistents en diferents tipus cel·lulars com les cèl·lules epitelials, les cèl·lules mesenquimals i les cèl·lules trofoblàstiques immerses en una matriu col·lagenosa.

Les membranes fetals i el líquid amniòtic que contenen tenen funcions molt importants per al creixement, el desenvolupament i la protecció del fetus. El líquid amniòtic permet al fetus moure's lliurement i tenir un creixement i desenvolupament muscular normal. La deglució, l'absorció digestiva i l'excreció urinària del líquid amniòtic faciliten un balanç hídric fetal correcte i el desenvolupament anatòmic i funcional dels sistemes gastrointestinal i genitourinari. A més a més, constitueix un sistema hídric amb el qual el líquid intrapulmonar està amb equilibri dinàmic, la qual cosa permet uns moviments respiratoris d'amplitud normal i un desenvolupament pulmonar òptim. El líquid amniòtic actua també com a amortidor enfront de traumatismes i manté en suspensió el cordó umbilical, reduint el risc de compressió durant les contraccions uterines i els moviments fetals. Addicionalment, les membranes fetals serveixen de barrera que separa el fetus i el líquid amniòtic estèrils del canal vaginal contaminat en contacte amb l'exterior.

Les membranes normalment es trenquen durant el part. La ruptura prematura de membranes (RPM) es defineix com el trencament prematur de membranes abans de l'inici de la dinàmica del part. La ruptura prematura de membranes que succeeix abans de la setmana 37 de gestació s'anomena ruptura prematura de membranes preterme.

Malgrat els avenços en les cures perinatals, l'RPM i l'RPM preterme continuen sent una complicació obstètrica important. El 8-10% de dones embarassades amb parts a terme presenten ruptura prematura de membranes; aquestes dones tenen un major risc d'infeccions intrauterines quan l'interval entre el trencament de membranes i el part es prolonga. L'RPM preterme succeeix en un 1% de tots els embarassos i està associada amb el 30-40% dels parts prematurs.

Tradicionalment, els obstetres han atribuït la ruptura de les membranes a l'augment de la pressió intrauterina secundària a les contraccions del part. Recentment s'ha suggerit que el trencament de membranes està relacionat amb processos bioquímics com el trencament de les fibres de col·lagen de la matriu extracel·lular tant de l'amni com del cori

i amb la mort cel·lular per apoptosi de les cèl·lules de les membranes fetals. S'ha proposat que les membranes fetals i la decidua responen a diferents estímuls com l'estirament de les membranes i la infecció produint mitjancers com les citocines, prostaglandines, etc., que dirigeixen les activitats dels enzims que degraden la matriu extracel·lular.

1.4.2.1. Estructura de les membranes fetals

L'amni és un derivat ectodèrmic format per cinc capes diferents. No conté ni venes ni nervis; els nutrients que requereix els hi subministra el líquid amniòtic. La capa interior, més propera al fetus, és l'epiteli amniòtic, les cèl·lules del qual secreten col·lagen de tipus III i IV i glicoproteïnes no col·lagenoses (laminina, nidogen i fibronectina que formen la membrana basal).

La capa compacta de teixit connectiu adjacent a la membrana basal forma el principal esquelet fibrós de l'amni. El col·lagen de la capa compacta és secretat per les cèl·lules mesenquimals de la capa fibroblàstica. El col·lagen intersticial (tipus I i III) és el predominant i forma feixos paral·lels que mantenen la integritat mecànica de l'amni. El col·lagen de tipus V i VI forma connexions filamentoses entre el col·lagen intersticial i la membrana basal de l'epiteli (Malak TM i col·l., 1993).

La capa fibroblàstica és la més prima de les capes que componen l'amni. Està formada per cèl·lules mesenquimals i macròfags immersors en una matriu extracel·lular. El col·lagen d'aquesta capa forma una xarxa laxa amb acumulacions de glicoproteïnes no col·lagenoses.

La capa esponjosa es troba entre l'amni i el cori. El seu contingut abundant en proteoglicans hidratats i glicoproteïnes fa que aquesta capa tingui l'aparença d'esponja en les preparacions histològiques. La capa esponjosa absorbeix la tensió física la qual cosa permet que l'amni llisqui sobre el cori el qual està fortament adherit a la decidua materna.

Encara que el cori és una capa més prima que l'amni, aquesta té una major elasticitat. El cori és un derivat mesodèrmic que s'origina a partir de la massa trofoblàstica. Aquesta capa té l'aparença típica d'una membrana epitelial. Les vellositats trofoblàstiques es van atrofiar a mesura que el fetus i el sac embrionari creixen des del lloc d'implantació cap a la paret oposada de la cavitat intrauterina. A diferència de l'amni, el cori està vascularitzat i els nutrients transportats per les venes arriben a l'amni per difusió.

Figura 1.8. Representació de l'estructura de les membranes fetals a terme. S'indica la composició de la matriu extracel·lular de cada capa així com els llocs de producció de les metal·loproteïnases de matriu (MMP) i dels seus inhibidors tissulars (TIMP).

Capa	Composició de la matriu extracel·lular	Tipus de MMP o TIMP produïts
AMNI		
Epiteli		MMP-1, MMP-2 MMP-9
membrana basal	Col·lagen tipus III, IV, V; laminina, fibronectina, nidogen	
Capa compacta	Col·lagen tipus I, III, V, VI; fibronectina	
Capa fibroblàstica	Col·lagen tipus I, III, VI; nidogen, laminina, fibronectina	MMP-1, MMP-9 TIMP-1
Capa esponjosa	Col·lagen tipus I, III, IV; proteoglicans	
CORI		
Capa reticular	Col·lagen tipus I, III, IV, V, VI; proteoglicans	
Membrana basal	Col·lagen tipus IV; laminina fibronectina	
Trofoblast		MMP-9

1.4.2.2. Mecanismes de la ruptura de membranes abans i durant el part

El trencament de membranes intrapart s'ha atribuït a un debilitament generalitzat a causa de les contraccions uterines i els estiraments repetits. S'ha observat que l'elasticitat de les membranes és menor en mostres obtingudes després del part en comparació amb mostres obtingudes durant cesària en dones que no estaven de part (Lavery JP i col·l., 1982). Les membranes amb ruptura prematura, això no obstant, sembla que són focalment defectives més que no pas que pateixin un debilitament generalitzat. L'àrea propera al lloc del trencament s'ha descrit com una zona amb alteracions morfològiques caracteritzades per una marcada disrupció de la xarxa fibril·lar de col·lagen de la capa compacta, fibroblàstica i esponjosa (Malak TM i col·l., 1994).

Malgrat les diferents característiques de l'RPM i del trencament de membranes intrapart, no hi ha evidències que suggereixin que els mecanismes que predisposen a l'RPM siguin diferents dels que normalment precedeixen el part. Això ha fet pensar que l'RPM representa una acceleració o exageració dels processos que es donen en el trencament espontani de membranes durant el part.

▪ **Canvis en el contingut, l'estructura i el catabolisme del col·lagen**

El manteniment de l'elasticitat de les membranes fetals sembla que depèn d'un equilibri entre la síntesi i la degradació dels components de la matriu extracel·lular. S'ha proposat que canvis en la membrana com un descens en el contingut de col·lagen, alteracions de la seva estructura així com increments en l'activitat col·lagenolítica, estan associats amb l'RPM.

Aquestes hipòtesis venen recolzades per l'observació que els desordres que afecten el teixit connectiu estan associats amb un debilitament de les membranes i amb una major incidència d'RPM preterme. La síndrome d'Ehlers-Danlos, un grup d'almenys onze malalties hereditàries del teixit connectiu caracteritzades per una hiperelasticitat de la pell, està causada per diversos defectes en la síntesi i estructura del col·lagen. En un estudi de 18 pacients amb síndrome d'Ehlers-Danlos, 13 (72%) van tenir parts prematures després d'una RPM preterme (Barabas AP, 1966). Addicionalment, és conegut que certes deficiències nutricionals que comporten alteracions en l'estructura de la fibra de col·lagen també estan associades amb un major risc d'RPM preterme. Per exemple, les unions entre les fibres del col·lagen, formades en una sèrie de reaccions iniciades per la lisil oxidasa, incrementen l'elasticitat de les fibres. La lisil oxidasa, que està produïda per les cèl·lules mesenquimals de l'amni, és un enzim dependent de coure i les dones amb RPM tenen concentracions inferiors de coure en sèrum (Artal R i col·l., 1979). De forma similar, el dèficit d'àcid ascòrbic, que és necessari per a la formació de l'estructura de triple hèlix del col·lagen, està associada amb una major incidència d'RPM (Wideman GL i col·l., 1964).

La degradació del col·lagen està mitjançada per metal·loproteïnases de matriu, les quals són inhibides per inhibidors tissulars específics. Les metal·loproteïnases de matriu (MMP) són una família d'enzims produïts per diferents tipus cel·lulars que hidrolitzen almenys un component de la matriu extracel·lular. La col·lagenasa MMP-1 i l'MMP-8 tallen la triple hèlix de les fibres de col·lagen de tipus I i tipus III les quals posteriorment són degradades per la gelatinasa MMP-2 i l'MMP-9. Aquestes gelatinases també degraden el col·lagen de tipus IV, la fibronectina i els proteoglicans. En membranes fetals humanes, s'ha localitzat l'mRNA de l'MMP-1 i l'MMP-9 en les cèl·lules epitelials de l'amni i en el trofoblast coriònic (Vadillo-Ortega F i col·l., 1995). Per tant, la capa compacta de les membranes fetals s'esté entre dues capes de cèl·lules que sintetitzen metal·loproteïnases de matriu.

Els inhibidors tissulars de les metal·loproteïnases formen complexos estequiomètrics 1:1 amb les metal·loproteïnases de matriu inhibint així, la seva activitat proteolítica. L'inhibidor tissular de la metal·loproteïnasa-1 (TIMP-1) s'uneix a la proteïna activa de l'MMP-1, l'MMP-8 i l'MMP-9, mentre que el TIMP-2 s'uneix tant a la forma activa com latent de l'MMP-2. La coordinació de l'activitat de les metal·loproteïnases de matriu i els seus inhibidors és essencial per al procés de remodelació de la matriu extracel·lular.

La integritat de les membranes fetals roman inalterada al llarg de la gestació, segurament a causa d'una combinació de baixa activitat de les metal·loproteïnases de matriu i una relativament alta concentració de TIMP-1 (Vadillo-Ortega F i col·l., 1996). Quan s'apropa el moment del part, això no obstant, el balanç entre l'activitat de les metal·loproteïnases de matriu i els seus inhibidors canvia cap a una degradació proteolítica de la matriu extracel·lular de les membranes. En humans, l'activitat de l'MMP-9 en l'amni i en el cori incrementa mentre que la concentració de TIMP-1 disminueix dràsticament en el moment del part. Les anàlisis de membranes obtingudes de cesàries electives i després d'un part espontani suggereixen que l'activitat de l'MMP-1 incrementa abans del part, l'MMP-9 i l'MMP-3 incrementen durant el part i la concentració de TIMP-1 incrementa després del part (Bryant-Greenwood GD i col·l., 1995). Aquests canvis reflecteixen la coordinació dels progressius processos que es donen abans i durant el part i que donen lloc a una degradació controlada del col·lagen de les membranes fetals.

L'RPM per tant, pot estar causada per un desequilibri entre les activitats de les metal·loproteïnases i els seus inhibidors, la qual cosa dona lloc a una degradació inapropiada de la matriu extracel·lular de les membranes. De forma general, l'activitat proteasa està incrementada en les membranes de dones amb RPM, sent l'MMP-9 l'activitat predominant (Draper D i col·l., 1995). Addicionalment, l'activitat gelatinolítica de l'MMP-9 està incrementada i la concentració de TIMP-1 és menor en líquid amniòtic de dones amb RPM preterme.

1.4.2.3. Fisiopatogènia de la ruptura prematura de membranes

Si les infeccions intrauterines són causa o conseqüència de l'RPM ha estat una qüestió llargament debatuda. Existeixen evidències indirectes que les infeccions del tracte genital poden donar lloc al trencament de membranes tant en animals com en humans. La

inoculació d'*Escherichia coli* en conills té com a resultat la infecció pel mateix microorganisme del líquid amniòtic i de la decídua en el 97% dels animals tractats i parts prematurs en la meitat d'aquests (Heddleston L i col·l., 1993). També, les dades epidemiològiques demostren que hi ha una associació entre la colonització del tracte vaginal per estreptococ del grup B, *Neisseria gonorrhoeae* i els microorganismes que causen vaginosi (anaeròbics vaginals, *Gardnerella vaginalis*, mobiluncus i micoplasma vaginal) i un major risc d'RPM preterme (Regan JA i col·l., 1981; Alger LS i col·l., 1988). Addicionalment, alguns estudis han provat que el tractament amb antibiòtics de dones infectades disminueix el nombre d'RPM preterme (McGregor JA i col·l., 1995).

Les infeccions intrauterines poden predisposar a l'RPM a través de diferents mecanismes cada un dels quals indueix la degradació de la matriu extracel·lular. Alguns dels microorganismes presents ocasionalment en la flora vaginal com ara l'estreptococ, *Staphylococcus aureus*, *Trichomonas vaginalis* i els microorganismes que causen vaginosi bacteriana, secreten proteases que poden degradar el col·lagen i debilitar les membranes fetals (McGregor JA i col·l., 1987).

La resposta immunològica de l'hoste a la infecció constitueix un altre potencial mecanisme que pot explicar en part l'associació entre infecció del tracte vaginal i l'RPM. La resposta inflamatòria està mitjançada per neutròfils i macròfags que són reclutats al lloc de la infecció i secreten citocines, metal·loproteïnases de matriu i prostaglandines. Les citocines proinflamatòries com ara l'IL-1 i el TNF- α incrementen l'expressió de l'MMP-1 i l'MMP-3 en cèl·lules coriòniques (So T i col·l., 1992). La resposta inflamatòria indueix, també, la producció de prostaglandines per les cèl·lules de les membranes fetals. Les prostaglandines es creu que incrementen el risc d'RPM preterme ja que causen contractibilitat uterina i degradació del col·lagen de les membranes. A més a més, la resposta immunològica a la infecció inclou la producció de citocines que incrementen la producció de prostaglandina E₂ per les cèl·lules coriòniques. L'estimulació per citocines de la producció de prostaglandina E₂ sembla que implica una inducció de la ciclooxigenasa II, enzim que converteix l'àcid araquidònic a prostaglandina. El mecanisme de regulació de la síntesi de prostaglandina E₂ en relació amb la infecció i la resposta inflamatòria de l'hoste no està ben definit i el vincle directe entre la producció de prostaglandines i l'RPM no està ben establert. Això no obstant, les prostaglandines (específicament la prostaglandina E₂ i la prostaglandina F_{2 α}) estan considerades com els mitjancers del part en tots els mamífers i la

prostaglandina E₂ disminueix la síntesi de col·lagen en les membranes fetals i incrementa l'expressió d'MMP-1 i MMP-3 en fibroblastes humans (Tjugum J i col·l., 1985).

L'increment d'aquests mitjancers biològics (citocines i prostaglandines) està considerat com un marcador de l'RPM, com també del part preterme (vegeu l'apartat 1.4.3). Aquests factors es troben elevats en el líquid amniòtic tant amb presència d'infecció de la cavitat intraamniòtica com en absència d'invasió microbiana d'aquesta cavitat en comparació amb parts normals (Gómez R i col·l., 1997; Keelan JA i col·l., 1997)

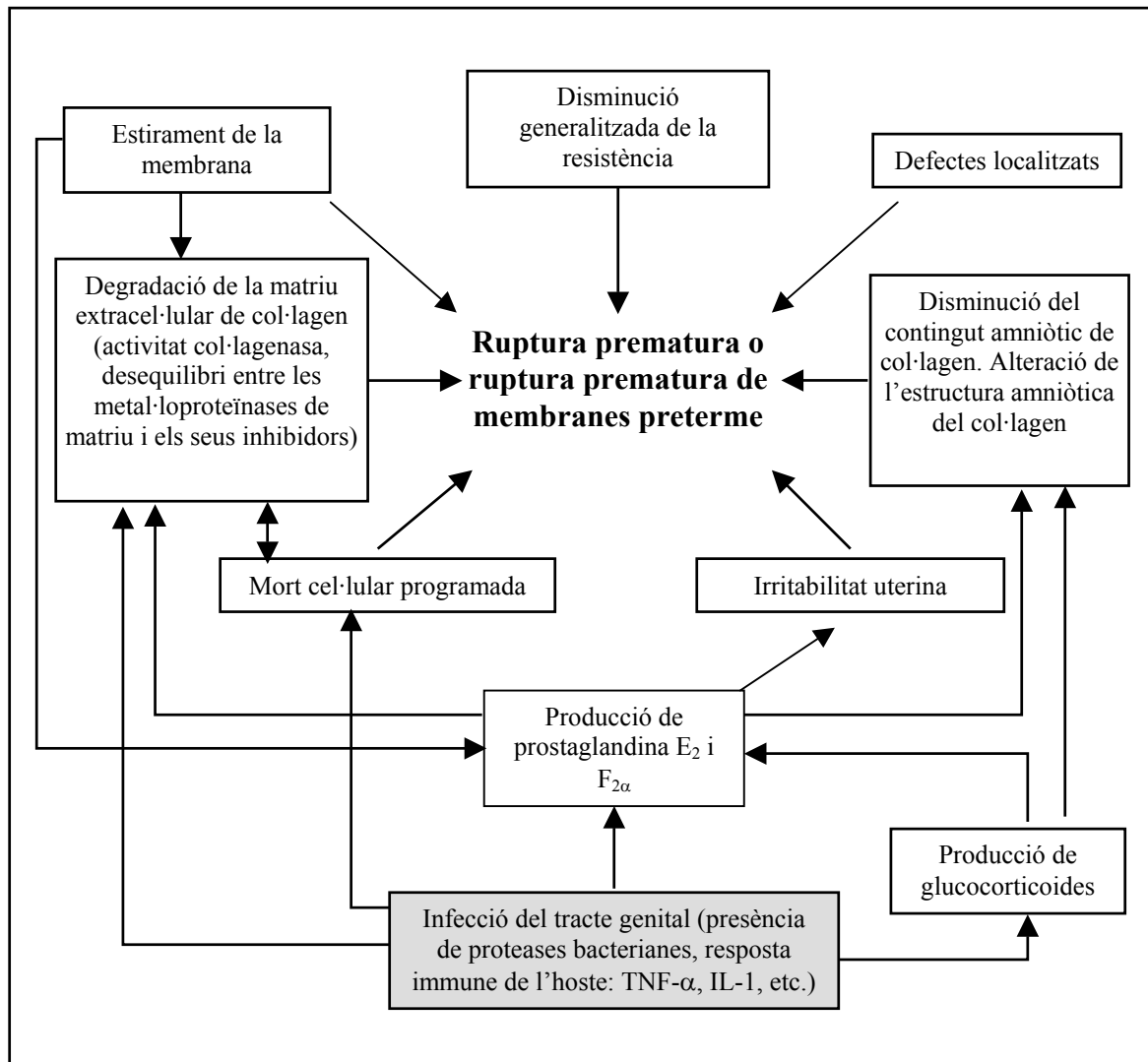
Un altre component de la resposta de l'hoste a la infecció és la producció de glucocorticoides. En la majoria de teixits l'acció antiinflamatòria dels glucocorticoides està mitjançada per la supressió de la producció de prostaglandines. Tanmateix, en alguns teixits com l'amni, els glucocorticoides paradoxalment estimulen la producció de prostaglandines.

Tal com s'ha assenyalat anteriorment, diferents estudis han descrit que l'activació endògena de les MMP de les membranes fetals, la col·lagenolisi de la matriu extracel·lular per les MMP i el debilitament localitzat de les membranes són un dels principals determinants de l'RPM. Addicionalment, s'ha descrit que el procés de mort cel·lular programada o apoptosi juga, també, un paper fonamental en l'RPM.

L'apoptosi està implicada en la remodelació de diferents teixits reproductius. H. Lei i col·laboradors (1996) van descriure que en rates les cèl·lules epitelials de l'amni esdevenen apoptòtiques quan el part s'apropa. També en humans s'ha observat que les membranes amniòtiques i coriòniques obtingudes després d'una RPM contenen cèl·lules apoptòtiques en les àrees adjacents al lloc de trencament. A més a més, en els casos de corioamnionitis, les cèl·lules apoptòtiques de l'epiteli amniòtic estan acompanyades de granulòcits, això suggereix que la resposta immunològica de l'hoste pot accelerar la mort cel·lular en les membranes fetals (Leppert PC i col·l., 1996). SJ. Fortunato i col·laboradors (2000) descriuen l'increment de diferents MMP (MMP2, MMP9, MMP3) i proteïnes proapoptòtiques (p53 i bax) en les membranes i líquid amniòtic durant l'RPM. Aquests mateixos autors en un estudi posterior (2001b) demostren que concentracions de TNF- α i LPS comparables a les observades en líquid amniòtic durant una infecció intraamniòtica indueixen l'expressió de diferents gens proapoptòtics en membranes fetals humanes, això

apunta que l'apoptosi mitjançada pel TNF- α es pot donar en membranes fetals humanes i que aquest procés podria tenir una funció important en la ruptura de les membranes fetals.

Figura 1.9. Esquema dels diferents mecanismes que poden donar lloc a la ruptura prematura de les membranes fetals.



1.4.2.4. Conseqüències neonatals de la ruptura prematura de membranes

- **Infecions.** La infecció és la causa principal de l'RPM, però també n'és una conseqüència. Tal com ja s'ha explicat anteriorment tant la mare com el fetus tenen un major risc d'infecció després de l'RPM i aquest és proporcional al temps que transcorre entre el trencament de les membranes i el part.

- **Part preterme.** El part prematur i les seves complicacions són les conseqüències més importants de l'RPM preterme i es discutiran en posteriors apartats. Si l'RPM preterme es produeix entre la setmana 28 i la 34, la meitat de les pacients pariran en el termini de 24 hores i el 80-90% ho faran en la primera setmana. Tanmateix, abans de la setmana 26 només el 50-60% donaran a llum en una setmana. El 90% de les pacients amb embarassos a terme iniciaran dinàmica de part en les 24 hores següents a l'RPM.

- **Hipòxia-isquèmia fetal.** Després de l'RPM, la probabilitat de prolapse del cordó augmenta (1,5%) sobretot en cas de presentacions fetals anòmales. La compressió del cordó en situacions d'oligoamni encara és més freqüent i la incidència se situa al voltant del 8,5% en gestacions preterme.

- **Síndrome de deformitat fetal per oligoamni.** Les conseqüències de la síndrome compressiva secundària a l'oligoamni són la dismòrfia facial de Potter, deformitats posicionals de les extremitats, retard de creixement i hipoplàsia pulmonar. D'aquests quatre components només la hipoplàsia té conseqüències importants a llarg termini. Els nens afectats tenen circumferències toràciques petites, insuficiència respiratòria greu que requereix reanimació agressiva i ventilació amb pressions positives elevades. Sovint es produeix pneumotòrax o emfisema intersticial. Moltes vegades, aquesta patologia es relaciona amb la immaduresa pulmonar secundària a la prematuritat característica de molts d'aquests infants i és difícil separar les seqüeles o complicacions derivades de cada una. Freqüentment, es correlaciona la gravetat de la síndrome per deformitat-compressió amb la gravetat de la hipoplàsia pulmonar que és major quan l'RPM es produeix abans de la setmana 26 de gestació.

La incidència de la hipoplàsia pulmonar és, amb tot, baixa (1-13% de tots els casos d'RPM). La síndrome per compressió és poc freqüent excepte en les RPM molt precoces (abans de la setmana 27-29) i duradores, això no obstant la seva evolució és generalment satisfactòria.

1.4.3. La prematuritat

La prematuritat és un concepte biològic que l'estableix el desenvolupament funcional del fetus. Si aquest neix abans d'haver arribat a la maduresa suficient per adaptar-se a la vida extrauterina i necessita d'unes cures especials per sobreviure, el part serà prematur. Generalment, hi ha una correlació entre edat gestacional, pes de naixement i maduresa del fetus, però com que hi ha nombroses excepcions és preferible parlar de part preterme si succeeix entre les setmanes 20 i 37 de gestació o de fetus de baix pes quan aquest no arriba als 2.500 g.

En termes quantitius la prematuritat constitueix l'11% aproximadament de tots els embarassos en els països desenvolupats, concretament, en el nostre país la incidència se situa al voltant del 7,5%. La prematuritat és una de les causes més importants de morbiditat i mortalitat perinatal, i és responsable del 60% de la mortalitat neonatal total i del 50% dels desordres neurològics congènits. El neonat prematur té una probabilitat 180 vegades major de morir que el fetus a terme i la possibilitat de presentar lesions residuals a curt i llarg termini és també molt més elevada (paràlisi cerebral, retinopatia, malaltia pulmonar crònica, etc). Tant la morbiditat com la mortalitat augmenten de forma inversa amb l'edat gestacional i el pes de naixement; així, la supervivència dels neonats amb pes inferior a 1.000 g i edat inferior a les 30 setmanes és tan sols del 60-70%.

En els darrers anys s'ha produït una important reducció en la morbiditat i mortalitat associades a la prematuritat segons diferents factors. En primer lloc, el millor coneixement d'alguns processos han evitat la prematuritat. Un clar exemple és la diabetis materna on un millor control i tractament evita la finalització prematura de l'embaràs i la fetopatia associada a la malaltia. D'altra banda, les estratègies preventives de patologies neonatals (maduració pulmonar, reducció de l'hemorràgia cerebral amb corticoides, profilaxi infecciosa intrapart per a la sèpsia per SGB, etc.) han suposat una reducció de la morbimortalitat perinatal. Finalment, la millora en les cures intensives neonatals (millors estratègies de ventilació, administració de surfactant, millor suport nutricional parental, millor control hidroelectrolític, disponibilitat de millors agents antimicrobians, etc.). Gràcies a les diferents intervencions abans esmentades, en els nadons de 1.000-1.500 g de pes, la mortalitat ha disminuït des d'un 50% l'any 1960 a un 5% actual i entre els neonats de pes entre 500-1.000 g, la mortalitat ha passat del 95% l'any 1960 al 20%.

1.4.3.1. Etiopatogènia del part preterme

Hi ha nombrosos factors que desencadenen el part preterme; els principals es relacionen a la taula 1.5. Tanmateix, es considera que aproximadament el 30-40% dels neonats prematurs ho són per causa d'un part prematur idiopàtic, és a dir, sense una patologia mèdica o obstètrica que hagi desencadenat necessàriament el part o la finalització de l'embaràs per decisió mèdica. Actualment, es creu que el 30-40% d'aquests prematurs idiopàtics es produeixen en associació, probablement de forma causal, amb una infecció.

Taula 1.5. Causes del part preterme.

Maternes	Malalties generals	Infeccions greus Nefropaties Cardiopaties Hepatopaties Endocrinopaties Hemopaties
	Afeccions obstètriques i ginecològiques	Infertilitat prèvia Embarassos seguits Gran multiparitat Amenaça d'avortament en el primer trimestre Ruptura prematura de membranes Corioamnionitis Toxèmia gravídica Alteracions cervicals uterines Mioma uterí Hidramni Traumatismes en l'embaràs Placenta prèvia Despreniment prematur de placenta
	Causes socials	Nivell socioeconòmic baix Treball físic intens Intoxicacions Toxicomanies, tabaquisme, alcoholisme Traumes psíquics Alimentació deficient
	Altres	Edat inferior als 20 anys o superior als 40 Antecedents de part prematur
Fetals	Bessons Malformacions congènites Cromosomopatia Primogènit	
Iatrogèniques Idiopàtic	Inducció precoç del part Cesària electiva	

*Figueras J. "El recién nacido prematuro". A: *Manual de Neonatología*. Natal A. i Prats J (ed.). Mosby, 1996.

Des de fa ja algunes dècades se sospita que l'inici del part preterme podria associar-se a infeccions intrauterines o fetals. Diversos treballs des dels anys 50 havien assenyalat que les dones amb part prematur presentaven una major freqüència d'infeccions associades a febre prepart i postpart.

Inicialment, es va associar la infecció intrauterina amb la ruptura de les membranes, la qual cosa permetia l'ascens de microorganismes patògens des de la vagina. Es va observar que la incidència d'infeccions augmentava en els casos de gestants a terme de forma proporcional al temps comprès entre el trencament i l'inici del part, sent el límit crític les 24 hores. Posteriorment, es va constatar que la infecció intrauterina no es presentava només en gestants amb ruptura de membranes (preterme o a terme), sinó que també podia succeir en gestants amb membranes íntegres. Aquesta observació va fer pensar que en alguns casos, com l'amenaça de part preterme (APP), la infecció intrauterina no era una troballa casual sinó que podia estar relacionada amb el mecanisme que desencadenava l'inici del part preterme. A més a més, aquesta hipòtesi podia ser també una explicació d'un nombre considerable d'APP de causa desconeguda, ja que la infecció intrauterina és moltes vegades subclínica i passa desapercibuda (Romero R i col·l., 1992a; McGregor JA, 1988; Gibbs RS i col·l., 1992; Gravett MG i col·l., 1986).

Són nombrosos els estudis publicats que recolzen la hipòtesi que una part dels parts prematurs idiopàtics es produeixen com a conseqüència d'una infecció de les membranes amniòtiques. Així per exemple, el treball publicat per Hillier i col·laboradors l'any 1988 va demostrar que la freqüència de cultius positius en parts preterme era del 61%, significativament major que el 21% detectat en placentes de parts a terme. Addicionalment, es va observar que els microorganismes més freqüentment aïllats corresponien a gèrmens habituals de les infeccions vaginals. Aquesta troballa recolza de forma indirecta el concepte que els microorganismes responsables de la infecció colonitzarien l'espai intermembranós a través d'una ruta ascendent pel canal del cervix des de la vagina.

Treballs posteriors al de Hillier han aportat més dades significatives que evidencien el paper de la infecció en el part preterme. A tall d'exemple s'ha demostrat que l'aïllament de microorganismes en el líquid amniòtic de parts preterme és més freqüent que en parts a terme. En el mateix sentit, també s'ha evidenciat que les dones amb parts preterme presenten cultius vaginals o cervicals positius per a gramnegatius amb una freqüència significativament més elevada que les dones amb parts a terme.

1.4.3.2. Paper de les citocines en el part preterme

Tal com s'ha comentat en l'apartat anterior, nombrosos estudis van demostrar que la infecció intrauterina s'associa freqüentment a l'APP en pacients amb membranes íntegres. Aquesta associació va portar que molts autors relacionessin la infecció com un dels mecanismes desencadenants més freqüents de l'APP, en gestants amb membranes íntegres.

Com una infecció intrauterina pot donar lloc al part preterme? El cori, l'amni així com la decidua, estimulats per diferents bacteris, tenen la facultat de produir prostaglandines i altres substàncies estimuladores de la musculatura uterina, capaces de provocar contraccions i modificar el cèrvix. No es coneix amb exactitud com els bacteris poden desencadenar l'inici del part, però una de les hipòtesis més plausibles seria que els bacteris podrien actuar sobre el metabolisme de l'àcid araquidònic. L'alliberació d'àcid araquidònic de les reserves de fosfolípids en les membranes fetals i la decidua és el principal punt limitant en la biosíntesi de prostaglandines i leucotriens. S'ha comprovat que aquesta reacció pot estar catalitzada per endotoxines i, a més, determinats gèrmens del tracte vaginal tenen activitat fosfolipasa (fosfolipasa A₂ i C).

D'altra banda, el concepte actual és que els senyals d'iniciació del part es desencadenen en la gestant com a conseqüència de la resposta inflamatòria que origina el sistema immunològic matern davant la presència de microorganismes. Les principals molècules candidates a actuar com a efectores són les citocines. Les evidències que recolzen el paper de les citocines proinflamatòries en la patogènia del part preterme es poden trobar en nombrosos estudis en líquid amniòtic, en teixits gestacionals *in vitro* i *in vivo* i en models animals.

Els models animals han estat utilitzats per demostrar que els productes bacterians i diverses citocines proinflamatòries poden produir avortament. A més, l'administració en animals de diferents citocines, com el TNF- α i l'IL-1, ha demostrat la capacitat d'aquests mitjancers per estimular les contraccions uterines i donar lloc finalment al part preterme (Bryk i col·l., 1993). En els diferents models animals utilitzats, els estudis han demostrat l'increment de citocines proinflamatòries en sèrum i en líquid amniòtic després de l'administració de lipopolisacàrid o de diferents bacteris (Fidel PL i col·l., 1994).

Altres línies de recerca s'han centrat en l'estudi de la capacitat de la decídua per produir citocines. La decídua és rica en macròfags, els quals poden produir una gran varietat de citocines davant la presència de determinats productes bacterians. Diferents treballs van demostrar, d'una banda, la capacitat de la decídua per produir diferents citocines en resposta a una infecció amniòtica i, d'altra banda, que l'augment en la síntesi de citocines promovia, per mitjà de l'activació de la ciclooxigenasa, l'augment de la producció de prostaglandines en la decídua, en l'amni i en el cori. Estudis posteriors han suggerit que també altres teixits com l'amni i el cori són capaços de sintetitzar citocines davant d'un estímul infecció.

D'altra banda, també són nombrosos els treballs publicats que associen l'increment en líquid amniòtic de la concentració de diferents citocines, com l'IL-1 β , el TNF- α , l'IL-6, l'IL-8, i l'IL-4, amb el part prematur. Aquestes citocines no es troben normalment en líquid amniòtic o estan presents en quantitats baixes que augmenten davant d'una infecció amniòtica (Romero R i col·l., 1992b; Dudley DJ i col·l., 1994).

La connexió crítica entre les citocines i el part prematur és la producció de metabòlits de l'àcid araquidònic pels teixits gestacionals en resposta a les citocines. De fet, diferents citocines (IL-1 β , TNF- α i IL-6) són capaces d'estimular la síntesi de prostaglandines en l'àmbit local, cosa que constitueix el primer pas per a l'establiment de la dinàmica uterina (Mitchell MD i col·l., 1995).

A partir d'aquests estudis es pot inferir alguns conceptes importants. Primer, les citocines per si mateixes no causen part preterme, sinó que són les mitjanceres de la resposta materna a un estímul inflamatori. Segon, els teixits gestacionals produeixen citocines proinflamatòries. Tercer, sembla poc probable que una resposta inflamatòria regulada de forma normal tingui com a resultat l'activitat uterina. Cal tenir en compte que els teixits gestacionals estan constantment en contacte amb la flora bacteriana vaginal i, en canvi, no totes les dones tenen un part preterme com a resultat d'un procés infecció. Això no obstant, si la resposta inflamatòria normal esdevé excessiva, llavors el resultat final pot ser el part prematur. En aquest sentit la resposta immunològica materna, més que l'agent infecció en si, és la que mitjancia el part preterme.

1.4.3.3. El TNF- α com a mitjancer del part preterme

Un dels primers investigadors que va suggerir que la infecció amniòtica podia provocar un increment de les citocines en el líquid amniòtic va ser Romero (1989b), el qual en un estudi va relacionar l'APP amb la infecció amniòtica subclínica, amb la hipòtesi que l'inici del part estava propiciat per factors endògens (citocines) que s'activaven davant d'una infecció. Els resultats de l'estudi van confirmar que el TNF- α *in vitro* augmenta la producció de prostaglandines en un cultiu de cèl·lules d'amni humà i que aquest augment era dosiddependent; a més quantitat de TNF- α més producció de prostaglandines. D'altra banda, en aquest mateix estudi es va observar que el TNF- α només es detectava en líquid amniòtic de gestants amb APP i infecció amniòtica (no es va detectar en gestants a terme, en gestants a terme que estaven amb treball de part ni en gestants amb APP sense infecció). Amb les dades obtingudes en aquest estudi, Romero va elaborar un model en el qual l'inici del part en aquest grup de pacients es desencadenava en activar les endotoxines la producció de TNF- α pels macròfags que es troben en la decídua. Al mateix temps, el TNF- α estimula la producció de prostaglandines per la decídua, l'amni i el cori; encara que el TNF- α és només un dels molts mitjancers que poden actuar en aquest procés. Molts altres treballs publicats posteriorment han corroborat aquesta hipòtesi: així, per exemple Hillier i col·laboradors (1993) en un estudi amb pacients afebrils, membranes íntegres i APP abans de la setmana 34 de gestació van concloure que l'increment de citocines, entre les quals el TNF- α , en líquid amniòtic estava relacionat amb part prematur, infecció del líquid amniòtic i corioamnionitis histològica.

El TNF- α i altres citocines poden, per tant, ser els intermediaris del desencadenament del part preterme associat a infecció mitjançant la inducció de la producció de prostaglandines. Tanmateix, aquesta hipòtesi pot també aplicar-se al part normal. Diferents estudis com el realitzat per Laham i col·laboradors (1994) van determinar la presència de TNF- α en líquid amniòtic de mostres obtingudes durant el segon i el tercer trimestre d'embaràs. La concentració, a més, d'aquesta citocina incrementa significativament durant la gestació, i se n'obtenen els nivells més alts en els casos de part preterme. En el mateix estudi en canvi, no es troben diferències en la concentració plasmàtica de TNF- α associat a l'embaràs, a l'increment de l'edat gestacional o amb el desencadenament del part ja sigui a terme o preterme. Aquesta absència de canvis en la concentració de TNF- α en plasma matern és consistent amb l'acció local o paracrina

d'aquesta citocina. Els autors conclouen que el TNF- α intrauterí pot tenir una funció important tant en els processos de maduració al final de la gestació com en els processos associats al desencadenament i progressió del part.

Pel que fa a l'origen tissular del TNF- α , les dades obtingudes de diferents estudis estableixen la placenta i la decidua com les fonts intrauterines de TNF- α . Casey i col·laboradors (1989) demostren que el TNF- α és secretat principalment per cèl·lules deciduals purificades i en una quantitat menor pel citotrofoblast. La secreció d'aquesta citocina incrementa amb el tractament amb LPS. Vince i col·laboradors (1992) van demostrar que el TNF- α es produeix constitutivament a la decidua i a les vellositats coriòniques durant l'embaràs. Utilitzant poblacions purificades mitjançant citometria de flux, aquests autors determinen que la producció de TNF- α es localitza exclusivament en els macròfags de la decidua i de les vellositats coriòniques. Aquests mateixos resultats van ser posteriorment corroborats per Steinborn i col·laboradors (1998a). Paral·lelament, es va determinar que el receptor TNFR-p55 s'expressa en el sinciciotrofoblast, en les cèl·lules endotelials vasculares i en algunes cèl·lules deciduals i cèl·lules de l'estroma placentari. El receptor p75 és també expressat per cèl·lules endotelials vasculares i per algunes cèl·lules estromals i deciduals; en canvi, no s'expressa en sinciciotrofoblast (Austgulen R i col·l., 1992a).

1.4.3.4. Tractament de la infecció per a la prevenció del part preterme

En els anys 70, es va observar que el tractament prolongat amb tetraciclina, iniciat en el segon trimestre, reduïa la freqüència de parts preterme tant en dones amb bacteriuria asimptomàtica com en les que no en tenien. Aquest tractament va caure en desús a causa dels problemes dentals i a la displàsia òssia dels infants (Elder HA i col·l., 1971).

En els darrers anys, els assaigs clínics de tractament prenatal per a la prevenció del part prematur s'han centrat en la vaginosis bacteriana, amb resultats interessants però alhora contradictoris. El conjunt de resultats suggereix que en dones amb antecedents de part prematur anterior i amb vaginosis bacteriana diagnosticada en el segon trimestre, el tractament durant una setmana o més amb metronidazole oral redueix significativament la incidència de parts preterme (Hauth JC i col·l., 1995). No es produeix una reducció significativa dels parts preterme quan els antibiòtics s'administren vaginalment, quan el tractament és de durada curta o els règims d'administració no inclouen metronidazole i

quan les dones tractades són de baix risc (definit com no haver tingut un part preterme anteriorment) (Carey JC i col·l., 2000; Vermeulen G i col·l., 1999).

Per a dones amb membranes íntegres i amb símptomes de part preterme, el tractament amb antibiòtics normalment no atura el part, ni redueix el risc de part preterme ni millora el pronòstic neonatal (Gibbs RS i col·l., 1997). En aquests estudis les dones van ser tractades amb penicil·lina i cefalosporina o eritromicina. Això no obstant, en dos petits assaigs randomitzats l'administració prolongada de metronidazole juntament amb penicil·lina resulta en una reducció en el nombre de parts preterme, en un augment de 200-300 g en la mitjana de pes de naixement i en una reducció de la morbiditat neonatal. Els resultats d'aquests estudis, però, s'han de prendre amb precaució ja que el nombre de pacients inclosos és molt baix i també perquè podria comportar l'ús excessiu d'antibiòtics durant l'embaràs (Norman K i col·l., 1994; Svare J i col·l., 1997).

En els casos de dones amb ruptura prematura de membranes, la prevenció del part preterme no és una finalitat raonable. Tanmateix, en aquestes pacients el tractament amb antibiòtics durant una setmana o més incrementa significativament el temps al part, redueix la incidència de corioamnionitis i millora la morbiditat neonatal (Mercer BM i col·l., 1997). De manera similar, en dones portadores d'estreptococ del grup B en la vagina el tractament amb penicil·lina durant el part redueix el risc de sèpsia neonatal; en canvi, no redueix la incidència de part preterme.

1.4.3.5. Conseqüències neonatals de la prematuritat

Les alteracions que poden aparèixer en un prematur depenen fonamentalment del grau de prematuritat, que s'associa amb l'edat gestacional. Els principals trastorns precoços que solen aparèixer ja en la primera setmana són els següents:

- **Control deficient de la termoregulació** amb tendència a la hipotèrmia.
- **Lesions encefàliques** relacionades amb l'anòxia i l'hemorràgia intraventricular.
- **Trastorns cardiocirculatoris**, amb gran tendència a l'hipotensió i possibilitat de persistència del ductus.
- **Alteracions metabòliques:** hipoglucèmia i hiperglucèmia, hipernatrèmia i hiponatrèmia, hipoclorèmia, hiperpotassèmia, hiperazoèmia, hiperamonièmia, hiperbilirubi-nèmia, acidosi, etc.

- ***Trastorns digestius*** i dificultat d'alimentació, que pot provocar malnutrició i altres afeccions (ili paralític, tap meconial, enterocolitis necrosant).
- ***Predisposició a les infeccions*** (sèpsia, pneumònia, etc).

Entre els trastorns o complicacions que apareixen més tard s'han descrit la retinopatia del prematur, l'anèmia del prematur, l'osteopènia del prematur, la displàsia broncopulmonar i seqüeles neurològiques com ara la hidrocefàlia posthemorràgica, la leucomalàcia periventricular, el retard mental i alteracions sensorials.

1.4.4. El TNF- α en la sèpsia neonatal de transmissió vertical i en el xoc sèptic

La sèpsia continua contribuint en gran mesura a la morbiditat i mortalitat durant el període neonatal. El diagnòstic precoç i un tractament adequat redueixen notablement la morbimortalitat del procés. Això no obstant, l'expressió clínica en els nounats és inespecífica i la confirmació de l'existència d'infecció mitjançant l'aïllament dels microorganismes en líquids corporals requereix temps. És per aquest motiu que la detecció ràpida i fiable d'aquest procés segueix sent un repte en la perinatologia actual.

▪ **Definicions:**

Els investigadors han estratificat l'espectre clínic de la sèpsia en diferents categories: la bacterièmia, la síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica (SIRS), la sèpsia, el xoc sèptic i la síndrome de la disfunció multiorgànica (MODS). El concepte de SIRS es va desenvolupar per designar una resposta clínica derivada d'una agressió greu no específica que inclou diferents entitats com per exemple una infecció, trauma, síndrome del destret respiratori, neoplàsies, cremades i pancreatitis. La SIRS es defineix per la presència de dues o més de les variables definides a la taula 1.6. La sèpsia és una resposta inflamatòria sistèmica (SIRS) a una infecció. La seqüela de la SIRS/sèpsia és la MODS la qual es pot definir com un fracàs en el manteniment de l'homeòstasi sense intervenció mèdica. La MODS primària és el resultat directe d'una agressió ben definida, mentre que la MODS secundària es desenvolupa no com una resposta directa a un estímul, sinó com a conseqüència de la resposta de l'hoste.

Existeix una continuació des del desenvolupament de la SIRS i l'inici de la sèpsia i la progressió cap a xoc sèptic i MODS, tot i que és important remarcar que el diagnòstic de SIRS té poca especificitat per a la predicció de sèpsia i xoc sèptic. S'ha observat que aquest sistema de classificació prediu la mortalitat d'una forma progressiva, així, segons dades obtingudes de població adulta, la mortalitat en la SIRS és del 7%, del 16% en la sèpsia, del 20% en la sèpsia greu i del 46% en el xoc sèptic (Rangel-Frausto MS i col·l., 1995).

S'anomena sèpsia neonatal la sèpsia que es manifesta dins dels primers 28 dies de vida. Clàssicament es diferencien dos patrons de malaltia de característiques epidemiològiques diferents: les sèpsies de transmissió vertical i les de transmissió horitzontal, que generalment són nosocomials. Es considera sèpsia vertical quan l'edat de

debut de la malaltia és inferior a les 72 hores de vida, si bé, pot iniciar-se passats els tres primers dies de vida sempre que es compleixin les premisses següents: presència de factors de risc de transmissió vertical, alteracions biològiques compatibles i absència de factors de risc de transmissió nosocomial.

Taula 1.6. Definicions.

Bacterièmia: presència de bacteris viables en la sang

Síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica (SIRS): síndrome clínica que representa la resposta de l'organisme a una àmplia varietat d'agressions i que es manifesta per la presència almenys de dues de les condicions següents:

1. Temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$
 2. Taquicàrdia (freqüència cardíaca > 160 pulsacions/minut en menors de 2 anys i > 150 pulsacions/minut en majors de 2 anys o una $\text{paCO}_2 < 32$ torr)
 3. Taquipnea (freqüència respiratòria > 60 inspiracions/minut en menors de 2 anys i > 50 inspiracions/minut en majors de 2 anys)
 4. Recompte leucocitari > 15.000 leucòcits/ μl o < 4.000 leucòcits/ μl o $> 10\%$ de neutròfils immadurs
-

Sèpsia: resposta inflamatòria sistèmica a la infecció que es manifesta per la presència de dos o més dels criteris per SIRS.

Sèpsia greu: sèpsia associada amb hipotensió (TA sistòlica $<$ percentil 5 per cada edat o un descens > 40 mmHg respecte de la TA sistòlica basal) i afectació o alteracions de la perfusió d'algun òrgan. Els signes d'hipoperfusió generalitzada inclouen, però no estan limitats a acidosi làctica (lactat venós > 2 mmol/l), oligúria, hipoxèmia o alteracions mentals agudes.

Xoc sèptic: sèpsia greu amb hipotensió, que no respon a la infusió de líquid, i presència d'alteracions de la perfusió o afectació d'algun òrgan.

Els pacients que reben agents inotrópics o vasopressors s'inclouen sempre en aquesta categoria.

Síndrome de disfunció multiorgànica secundària a sèpsia (MODS): afectació o insuficiència orgànica en pacients greus que no poden mantenir l'homeòstasi sense intervenció mèdica. Es caracteritza per qualsevol combinació de coagulació intravascular disseminada, síndrome del destret respiratori de l'adult, insuficiència renal aguda, alteracions hepatobiliars agudes o alteracions agudes de l'estat mental.

De l'American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Les modificacions per pediatria s'han basat en Jafari i McCracken. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1992; 11:739-749.

1.4.4.1. Epidemiologia de la sèpsia neonatal vertical

En la sèpsia de transmissió vertical, el contagi es produeix per via ascendent al final de la gestació o bé per contacte amb les secrecions vaginals contaminades en el moment del part. La taxa de transmissió depèn del microorganisme, del grau de colonització (mida de l'inòcul), del nombre de parts afectades (recte, vagina, orina), de la susceptibilitat de l'hoste, així com de factors socioeconòmics, de les pràctiques obstètriques i de la salut i nutrició de la mare, entre altres. A més, hi ha un conjunt de situacions obstètriques que es consideren factors de risc d'infecció neonatal:

- Part preterme o baix pes de naixement.
- Trencament patològic de les membranes fetals que comprèn la ruptura prematura o el trencament perllongat de més de 18 hores.
- Colonització vaginal per microorganismes patògens (els més habituals són l'estreptococ beta-hemolític del grup B i *Escherichia coli*).
- Sospita de corioamnionitis.
- Vaginosi bacteriana.
- Part traumàtic.
- Hipòxia fetal.

▪ Incidència

La incidència de la sèpsia neonatal vertical varia entre els diferents hospitals i també amb els anys. En el nostre hospital la incidència de la sèpsia vertical observada entre els anys 1988 i 1996 va ser del 6‰ dels nadons vius, amb variacions de l'1,3‰ fins al 9,1‰, segons els anys. La incidència de sèpsies verticals amb hemocultiu positiu va ser del 2,3‰ durant el mateix període d'estudi (comunicació personal Dr. Natal, cap de la Secció de Neonatologia). De forma similar, en l'estudi del Grup Castrillo (1997) la incidència de sèpsia vertical demostrada entre els anys 1995-97 va ser del 2,5‰ dels nounats vius, també, López Sastre i col·laboradors (1997) de l'Hospital Central d'Astúries publiquen dades d'incidència del 3,3‰ (període 1992-96) amb un 6,3‰ de sèpsies clíniques durant l'any 1996.

La incidència de la sèpsia vertical és molt superior en els nadons amb pes inferior als 1.500 g. A tall d'exemple, en l'estudi de l'Hospital Central d'Astúries la incidència

observada de sèpsia vertical demostrada en nadons de < 1.500 g, va ser del 40,8‰.

La taxa de mortalitat en la sèpsia vertical oscil·lava entre el 15-50%, encara que amb una tendència a disminuir progressivament. Entre els anys 1988 i 1997, en el nostre hospital es va estimar que la sèpsia vertical era la responsable del 23% de la mortalitat neonatal (Almazán F i col·l., 2000). Altres estudis com el del Grup Castrillo situen la mortalitat per sèpsia vertical en un 8,7% (30,6% en nadons de pes < 1.500 g) i en un 10,3% (33,3% en nadons de pes < 1.500 g) en l'estudi realitzat a l'Hospital Central d'Astúries.

És important assenyalar que les dades presentades en aquest apartat s'han obtingut d'estudis anteriors a l'any 1997, període en el qual vam dur a terme aquest treball. La situació, tant pel que fa a la incidència com a la mortalitat de la sèpsia vertical, ha canviat significativament a partir de l'any 1998 amb la instauració del protocol de profilaxi de la infecció per SGB. Des del 1998 al 2000, en el nostre hospital, la incidència de la sèpsia vertical demostrada ha disminuït fins al 0,3‰ dels nounats vius, amb una mortalitat del 0% (Sitja N i col·l., 2001).

La situació en els països en vies de desenvolupament és, però, molt diferent. Els pocs estudis, basats en les dades hospitalàries de què es disposa, situen la incidència de la sèpsia neonatal entre el 2‰ i el 21‰ dels naixements vius amb una mortalitat de l'1-69% (la majoria dels estudis descriuen una mortalitat superior al 30%). Utilitzant aquestes dades i l'estimació de les Nacions Unides aproximadament de 126.377.000 naixements per any en els països en desenvolupament, es pot calcular que el nombre de casos de sèpsia neonatal és al voltant d'uns 750.000 per any. Cal tenir en compte que la majoria de naixements en aquests països es produeixen a casa, a més de la manca d'assistència mèdica en cas de malaltia per la qual cosa és indubtable que aquestes dades d'incidència i mortalitat són només una infravaloració del nombre real d'aquestes infeccions.

▪ Etiologia

L'etiologia de la sèpsia vertical ha anat canviant al llarg dels anys. Entre el 1965 i el 1975, el bacteri que més freqüentment s'aïllava era *Listeria monocytogenes*. Posteriorment, fins a principis dels anys 80 va predominar *E. coli* i des d'aleshores han anat incrementant les infeccions verticals per *Streptococcus agalactiae* o SGB. Freedman i col·laboradors, l'any 1981, van revisar l'etiologia de la sèpsia vertical durant un període de

50 anys (1928-78) i van observar que fins a l'any 1966 l'aïllament de SGB era excepcional mentre que del 1966 al 78 va ser responsable del 32% de les sèpsies neonatals. Gladstone i col·laboradors (1990) amplien la revisió fins a l'any 1988 i observen que el SGB és responsable del 37% de les sèpsies.

Sembla evident que en els darrers anys les infeccions neonatals per SGB han anat incrementant fins a convertir-se en el principal microorganisme responsable de les sèpsies verticals. En el nostre hospital, entre els anys 1988 i 1996, l'SGB va ser el causant del 59,5% de les sèpsies verticals, freqüència molt similar a les trobades pel Grup Castrillo (51%) i l'Hospital Central d'Astúries (56,4%).

Aquest augment de la infecció per SGB té relació amb la taxa de colonització vaginal materna en el moment del part. Als EUA oscil·la entre el 10-29% i a Espanya entre el 7,1 i el 16,5%. Es calcula que entre el 50-75% dels nadons de mares portadores de SGB s'infecten i que l'1-2% desenvolupen la malaltia (Anthony BF i col·l., 1978).

1.4.4.2. Fisiologia de la inflamació

La capacitat innata de l'organisme per defensar-se es basa en tres elements: barreres externes que eviten la invasió i el dany dels teixits, sistemes no específics contra patògens externs i resposta als patògens antigenspecífica.

La inflamació és la resposta inicial no específica de l'organisme al dany tissular produït per estímuls mecànics, químics o infecciosos. La inflamació és una resposta cel·lular i humoral controlada que s'amplifica ràpidament: les cascades del complement, de les citocines, de la coagulació i de la fibrinòlisi s'activen en tàndem amb l'activació dels fagòcits i de les cèl·lules endotelials (Collins FM, 1978). Aquesta resposta local es pot considerar beneficiosa sempre que el procés inflamatori estigui regulat de forma apropiada per tal de mantenir les cèl·lules i els mitjancers segrestats.

En el procés inflamatori hi ha quatre esdeveniments principals: la vasodilatació, un increment de la permeabilitat microvascular, activació i adhesió cel·lular i coagulació. La vasodilatació i l'increment de la permeabilitat microvascular en el lloc on s'ha produït el dany incrementa la disponibilitat local d'oxigen i nutrients i produeix calor, inflor i edema tissular. Els canvis hemodinàmics locals donen lloc als quatre símptomes clàssics associats a la inflamació local: eritema, edema, calor i dolor. La resposta fisiològica normal a

l'estrès i al dany té com a conseqüència una sèrie de canvis cardiovasculars (augment de la freqüència cardíaca, de la contractilitat i del rendiment cardíac) i canvis neuroendocrins (increment de l'alliberació de catecolamines, de cortisol, d'hormona antidiürètica, d'hormona del creixement, del glucagó i de la insulina). Es produeix, també, un increment en el requeriment de fluid degut al tercer espai. El principal canvi metabòlic que s'esdevé com a resposta a la inflamació és un increment inicial en el consum d'oxigen. La diferència arteriovenosa en el contingut d'oxigen romandrà igual sempre que la pressió de perfusió es mantingui; no obstant això, el metabolisme anaeròbic contribuirà a l'homeòstasi en cas que l'organisme no arribi a compensar el dèficit d'oxigenació (Dantzker DR i col·l., 1991). L'efecte màxim d'aquests canvis fisiològics locals i sistèmics succeeix al cap de 3-5 dies de l'estímul inicial i decau als 7-10 dies. Clínicament, la disminució progressiva del requeriment de fluid del tercer espai i una tendència descendent en el pols i la temperatura seguit de diüresi espontània indiquen una millora en el curs de la clínica.

Les citocines, principalment el TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, els interferons i els CSFs, són els missatgers fisiològics de la resposta inflamatòria mentre que els efectors cel·lulars són els polimorfonucleòcits (PMN), els monòcits/macròfags i les cèl·lules endotelials. L'activació leucocitària dona lloc a una major agregació dels leucòcits i infiltració tissular alhora que incrementen la producció de citocines i altres mitjancers de la inflamació.

Les cèl·lules endotelials exposades a aquest ambient ric en factors humerals i factors derivats dels leucòcits esdevenen també activades i comença l'expressió de diferents molècules d'adhesió i de receptors de superfície juntament amb la síntesi i secreció de citocines addicionals i segons mitjancers de la inflamació com prostaglandines, leucotriens, tromboxans, factor d'activació plaquetari (PAF), radicals lliures d'oxigen, òxid nítric i proteases. Alguns d'aquests mitjancers secundaris de la inflamació són també sintetitzats pels leucòcits. La presència de cèl·lules endotelials activades i d'un medi amb major concentració de citocines dona lloc a l'activació de les cascades de la coagulació dirigides a la formació de trombes locals que minimitzaran la pèrdua de sang i facilitaran la compartimentació dels teixits danyats, en un intent d'aïllar fisiològicament les àrees inflamades.

1.4.4.3. Fisiopatologia de la síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica

La inflamació localitzada és una resposta fisiològica protectora que generalment controla l'organisme en el lloc on s'ha produït el dany. La pèrdua d'aquest control local dona lloc a una resposta sistèmica exagerada que clínicament s'identifica com a SIRS. RC. Bone (1996) va proposar que la SIRS es desenvolupa en tres estadis. En l'estadi I, en resposta a una agressió o a un dany, l'ambient local produeix citocines destinades a provocar una resposta inflamatòria, reparar la ferida i reclutar cèl·lules del sistema reticuloendotelial. En l'estadi II, s'alliberen petites quantitats de citocines a la circulació per potenciar la resposta local. Es recluten macròfags i plaquetes i s'estimula la producció de factors de creixement. S'inicia la fase aguda de la resposta la qual està altament controlada per una reducció simultània de la producció de citocines proinflamatòries i l'alliberació de mitjancers antagonistes. Aquests mitjancers mantenen la resposta inflamatòria inicial controlada amb una disminució de la producció de citocines i alhora contrarestant els efectes de les citocines ja alliberades. Aquest procés continua fins que la ferida es cura, la infecció es resol i es restableix l'homeòstasi. Ocasionalment, l'homeòstasi no es restableix, amb la qual cosa comença l'estadi III (SIRS). Amb la pèrdua de l'homeòstasi comença una reacció sistèmica massiva on els efectes de les citocines esdevenen destructius més que no pas protectors. La gran quantitat de mitjancers inflamatoris estimulen nombroses cascades humorals i donen lloc a una activació sostinguda del sistema reticuloendotelial amb pèrdua de la integritat de la microcirculació i dany a diferents òrgans distals.

Les manifestacions essencials de la SIRS són la vasodilatació, la disminució de les resistències vasculars sistèmiques, mala distribució del flux sanguini, depressió miocàrdica, hipotensió arterial, defecte d'extracció d'oxigen en els teixits, disminució del consum d'oxigen i acidosi làctica. Tot i que els canvis en el flux i la permeabilitat en una àrea localitzada incrementen l'aportació de nutrients, una vasodilatació sistèmica descontrolada produeix un descens sostingut de la resistència vascular i la hipotensió que comporten un estancament de líquids en la perifèria; això, juntament amb l'increment de la permeabilitat vascular dona lloc a l'extravessament de gran quantitat de líquid als teixits i a la formació d'edema. Paral·lelament es produeix una depressió de la contractilitat deguda possiblement a un efecte paracrí de l'òxid nítric i al dany (no oclusiu) de la microvasculatura coronària i dels miòcits (Quezado ZM i col·l., 1992). La vasodilatació

juntament amb la microembolització per agregació leucocitària fa que hi hagi una mala distribució del flux sanguini que pot comportar la hipoperfusió d'alguns òrgans i alhora interferir amb els processos de difusió de l'oxigen a les cèl·lules. La lesió endotelial augmenta la permeabilitat microvascular i dóna lloc a l'edema que interfereix encara més en els processos de difusió de l'oxigen comprimint capil·lars i augmentant les distàncies de difusió. La conseqüència d'aquestes alteracions és la incapacitat dels teixits per extreure l'oxigen que necessiten tot i que existeixi un rendiment cardíac normal o elevat. Al mateix temps, s'inicia el metabolisme anaeròbic el qual dóna lloc a l'acidosi làctica.

A l'inici del procés de la SIRS, gran quantitat de leucòcits esdevenen adherents per a les cèl·lules endotelials activades de les parets vasculars i poden arribar a interrompre el flux microcirculatori (Hinshaw LB, 1996). L'adherència leucocitària està relacionada amb un increment en el nombre de molècules d'adhesió presents en les cèl·lules endotelials. El TNF- α , l'IL-1 i altres mitjancers de la inflamació estimulen l'expressió en les cèl·lules endotelials de més i noves molècules d'adhesió. A més de la interrupció mecànica del flux microcirculatori, els leucòcits activats poden danyar les cèl·lules endotelials adjacents i el teixit extravascular circumdant. El TNF- α i l'IL-1 estan considerats mitjancers primaris proinflamatoris i inductors d'un ampli conjunt de mitjancers secundaris de la inflamació. Les cèl·lules endotelials activades expressen nombrosos factors (ex. factor tissular, tromboxà, etc.) que transformen l'ambient inicialment neutre cap a procoagulant.

Aquestes respostes sistèmiques, potencialment danyines, en la SIRS contribueixen al desenvolupament de grans canvis fisiopatològics en diferents òrgans, els quals es consideren els principals factors etiològics del desenvolupament del xoc sèptic, de la síndrome de la coagulació intravascular disseminada (Gando S i col·l., 1996), de la síndrome del destret respiratori dels adults i d'altres disfuncions orgàniques que donen lloc a la MODS. Lligat a aquest fracàs orgànic es produeixen efectes metabòlics els quals produeixen febre, hipermetabolisme, anorèxia, catabolisme de proteïnes, caquèxia i alteració del metabolisme dels greixos i de la glucosa (Souba WW, 1994).

1.4.4.4. Mitjancers de la síndrome de la resposta inflamàtoria sistèmica

El desenvolupament de la sèpsia està relacionat amb una complexa interacció de mitjancers lipídics, proteics i possiblement carbohidrats. Malgrat la gran varietat de

mitjancers implicats en el desenvolupament de la sèpsia, les citocines són els factors decisius que determinen la fisiopatologia d'aquesta malaltia.

La resposta de mitjancers en la SIRS es pot dividir en quatre fases: inducció, estimulació de la síntesi de citocines, evolució de la cascada de citocines i elaboració de mitjancers secundaris amb el consegüent dany cel·lular. Dels nombrosos mitjancers que operen en la SIRS/sèpsia, els que mostren una major influència són el TNF- α , l'IL-1 i l'IL-6. Tant en humans com en models de sèpsia en animals d'experimentació, les citocines se secreten de forma seqüencial i donen lloc a una cascada de citocines. Aquesta cascada s'inicia quan un estímul indueix la producció i secreció de les citocines primàries que inclouen el TNF- α i l'IL-1, els quals intervenen en la majoria d'alteracions fisiològiques característiques de la sèpsia. Així, infusions de TNF- α o d'IL-1 indueixen xoc sèptic en diferents models d'experimentació animal; a més, alguns inhibidors d'aquestes citocines poden revertir algunes de les manifestacions clíniques de la sèpsia experimental. Les citocines primàries estimulen la producció de citocines més tardanes com ara l'IL-6 i l'IL-8 que intensifiquen i perpetuen la resposta inflamatòria.

Tanmateix, les dades sobre la utilitat d'aquests mitjancers com a marcadors de la infecció no són coincidents. Cal tenir en compte que a més de la cascada de citocines proinflamatòries, durant la resposta inflamatòria s'activa, també, la producció de citocines neutralitzadores o antagonistes com els sTNFR i els IL-1R, que modifiquen la resposta inflamatòria de l'hoste. Les manifestacions clíniques de la sèpsia estan determinades per la complexa xarxa d'interaccions entre citocines proinflamatòries i citocines anti-inflamatòries. Actualment es disposa de poca informació sobre la cinètica de la producció de les diferents citocines i dels seus inhibidors, així com de les interaccions *in vivo* i de les conseqüències clíniques que se'n deriven.

1.4.4.5. El TNF- α en la síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica

Tal com s'ha assenyalat anteriorment el TNF- α és un dels mitjancers primaris de la resposta inflamatòria (Strieter RM i col·l., 1993).

La infusió de TNF- α recombinant en humans dóna lloc a SIRS amb febre, canvis hemodinàmics, leucopènia i coagulopatia (Chapman PB i col·l., 1987; Sherman ML i col·l., 1988; van der Poll T i col·l., 1990). En estudis utilitzant models animals l'administració de TNF- α

causa hipertensió pulmonar, hipoxèmia, descens de la compliança pulmonar i increment de la permeabilitat microvascular dels pulmons (Johnson J i col·l., 1989; Wheeler AP i col·l., 1990). En models animals i humans de sèpsia induïda amb endotoxina, la producció de TNF- α s'activa ràpidament; així, Michie i col·laboradors (1988) van observar que després d'haver administrat endotoxina d'*E. coli* a voluntaris sans les concentracions de TNF- α incrementaven significativament i arribaven a un màxim als 60-90 minuts, moment en el qual començaven a aparèixer els símptomes anteriorment descrits. Contràriament, la immunització passiva de ratolins amb anti TNF- α prevé l'endotoxèmia letal (Beutler B i col·l., 1985a). Així mateix, els ratolins modificats genèticament, deficients per al gen que codifica pel TNF- α , són resistent al xoc sèptic induït per l'endotoxina.

El TNF- α té un paper significatiu en la coordinació de la resposta inflamatòria i en l'activació de la cascada de citocines. *In vitro*, el TNF- α és un potent inductor d'altres citocines com ara l'IL-1 β , l'IL-6 i l'IL-8. En monos injectats amb *E. coli*, el tractament amb anticossos anti TNF- α disminueix la producció d'IL-1 β , IL-6 i IL-8, a més de reduir la morbiditat i la mortalitat (Fong Y i col·l., 1989; Redl H i col·l., 1993; Tracey KJ i col·l., 1987).

En pacients amb sèpsia es detecten concentracions elevades de TNF- α i, generalment, correlacionen amb la gravetat i l'evolució de la malaltia. Endo i col·laboradors (1992) van observar un increment de les concentracions de TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-2 en plasma de pacients amb xoc sèptic comparat amb les de pacients amb sèpsia o amb els controls sans. Igualment, Waage i col·laboradors (1987) van trobar un augment de la concentració en sèrum de TNF- α en 10 dels 11 pacients que van morir per meningococcèmia, mentre que només 8 dels 68 supervivents tenien concentracions similars. Contràriament, alguns estudis no han pogut demostrar que l'elevació inicial de les concentracions de TNF- α prediu l'evolució clínica. Per exemple, LC. Casey i col·laboradors (1993) descriuen que les concentracions de TNF- α , IL-1 β , IL-6 i endotoxina en pacients amb sèpsia estan augmentades en comparació amb les de pacients ingressats a la unitat de cures intensives sense sèpsia, però les concentracions de TNF- α no prediuen la mortalitat de forma independent. En aquest estudi tan sols el 54% dels pacients amb sèpsia tenien concentracions detectables de TNF- α en plasma.

Altres estudis han demostrat que l'elevació persistent de la concentració de TNF- α és un factor pronòstic de mala evolució clínica en pacients amb sèpsia. Martin i

col·laboradors (1994) avaluen les concentracions plasmàtiques seriades de TNF- α i d'IL-6 en 30 pacients amb xoc sèptic. Tots els pacients presentaven concentracions plasmàtiques elevades tant de TNF- α com d'IL-6. Els no supervivents tenien uns nivells de TNF- α persistentment més elevats que els supervivents i en canvi, no es van observar diferències en les concentracions d'IL-6. Pinsky i col·laboradors (1993) demostren que les concentracions de TNF- α i d'IL-6 són més altes en els pacients amb xoc sèptic i que la persistència de TNF- α i d'IL-6 en sèrum més que un pic en les concentracions és un factor de mal pronòstic en pacients amb xoc.

Pel fet que la producció de TNF- α es pot induir ràpidament amb endotoxina, que la seva administració causa un estat de sèpsia, que pot activar la producció d'altres mitjancers i que la seva concentració està augmentada en els pacients amb sèpsia, es pot considerar al TNF- α com un mitjancer central de la sèpsia.

1.4.4.5.1. Efectes proinflamatoris del TNF- α

▪ Efectes en les cèl·lules endotelials

El TNF- α exerceix diferents efectes en les cèl·lules endotelials que són capaços de modificar diversos sistemes. Les alteracions més importants inclouen:

a) Coagulació. El TNF- α estimula l'alliberació dels factors tissulars, PAF (factor activador plaquetari) i von Willebrand, la qual cosa promou la formació de coàguls i, per tant, la trombosi. A més, el TNF- α inhibeix la síntesi i alliberament de la trombomodulina i això ocasiona una activació defectuosa de la trombina per la proteïna C amb la subsegüent disminució de les propietats anticoagulants de la superfície endotelial. La fibrinòlisi està inhibida pel TNF- α mitjançant la inhibició de l'alliberació del factor tissular activador del plasminogen, que és essencial per a la conversió del plasminogen a la proteasa activa plasmina la qual pot dissoldre la fibrina dels trombes. El TNF- α limita també la fibrinòlisi mitjançant l'alliberament de factors inhibidors del plasminogen com la PAI-1. Aquests efectes procoagulants serveixen per aïllar el focus de la infecció de la circulació sistèmica. Alternativament, els mateixos efectes a una escala més gran poden afavorir el desenvolupament de la coagulació intravascular disseminada (Clauss M i col·l., 1992).

b) Adhesió cel·lular. La mobilització dels leucòcits cap a les zones infectades requereix la seva unió a la superfície vascular. En presència de TNF- α , diferents classes de molècules d'adhesió incrementen la seva expressió o bé són sintetitzades *de novo* a la superfície de les cèl·lules endotelials. Per exemple, el TNF- α indueix l'expressió de la molècula-1 d'adhesió intercel·lular (ICAM-1), de la molècula-1 d'adhesió leucòcit-endoteli (ELAM-1), de la molècula-1 d'adhesió de cèl·lules vasculares (VCAM-1) i de la selectina E (Gamble WB i col·l., 1992).

c) Quimiotaxi/Transmigració. Després de la unió a l'endoteli, els leucòcits han de deixar el compartiment vascular per combatre de forma efectiva els patògens. *In vitro*, el TNF- α estimula l'alliberació de quimiocines necessàries per a la transmigració. *In vivo*, causa la marginació dels neutròfils, la qual cosa explica el descens del recompte de leucòcits que s'observa després d'una infusió de TNF- α (Ulich TR i col, 1987). Durant la inflamació, l'adhesió s'acompanya d'una migració cel·lular transendotelial. En alguns casos es produeix un desequilibri entre aquests dos processos i es troba només present l'adhesió, que dona lloc a un segrest intravascular. Els mecanismes responsables d'aquest desequilibri no són del tot clars, però és probable que hi jugui un paper l'expressió diferencial de molècules d'adhesió. Sembla que es requereix de diferents classes de molècules perquè es doni merament adhesió o bé adhesió seguida de transmigració. També és necessària la pèrdua d'algunes molècules d'adhesió per desadherir-se i assegurar la transmigració. Finalment, la funció de certs enzims és essencial per determinar si la transmigració seguirà o no a l'adhesió. Per exemple, la síntesi de col·lagenasa, induïda pel TNF- α (Dayer J-M i col·l., 1985), pot modular la migració i permetre el trànsit a través de la membrana basal.

d) Altres efectes. El TNF- α activa l'alliberació per part de les cèl·lules endotelials de prostaglandina E₂, prostaciclina I₂, tromboxà A₂, òxid nítric (que té un efecte vasodilatador) i l'endotelina (vasoconstrictor). Aquests mitjancers poden exercir efectes contraposats i la influència neta del TNF- α dependrà del lloc on és produït i del llit vascular amb el qual interacciona. A més dels efectes en el to vascular, aquests mitjancers terminals dels efectes del TNF- α poden afectar l'agregació plaquetària. El TNF- α exerceix també efectes directes com la citotoxicitat sobre les cèl·lules endotelials i l'increment de la permeabilitat capil·lar (Sato N i col·l., 1986; Horvath CJ i col·l., 1988). Finalment, altres efectes del TNF- α com la capacitat per induir reordenament dels filaments d'actina comporta

canvis estructurals en les cèl·lules endotelials i la pèrdua de les unions intercel·lulars, que dona lloc a un increment de la permeabilitat capil·lar.

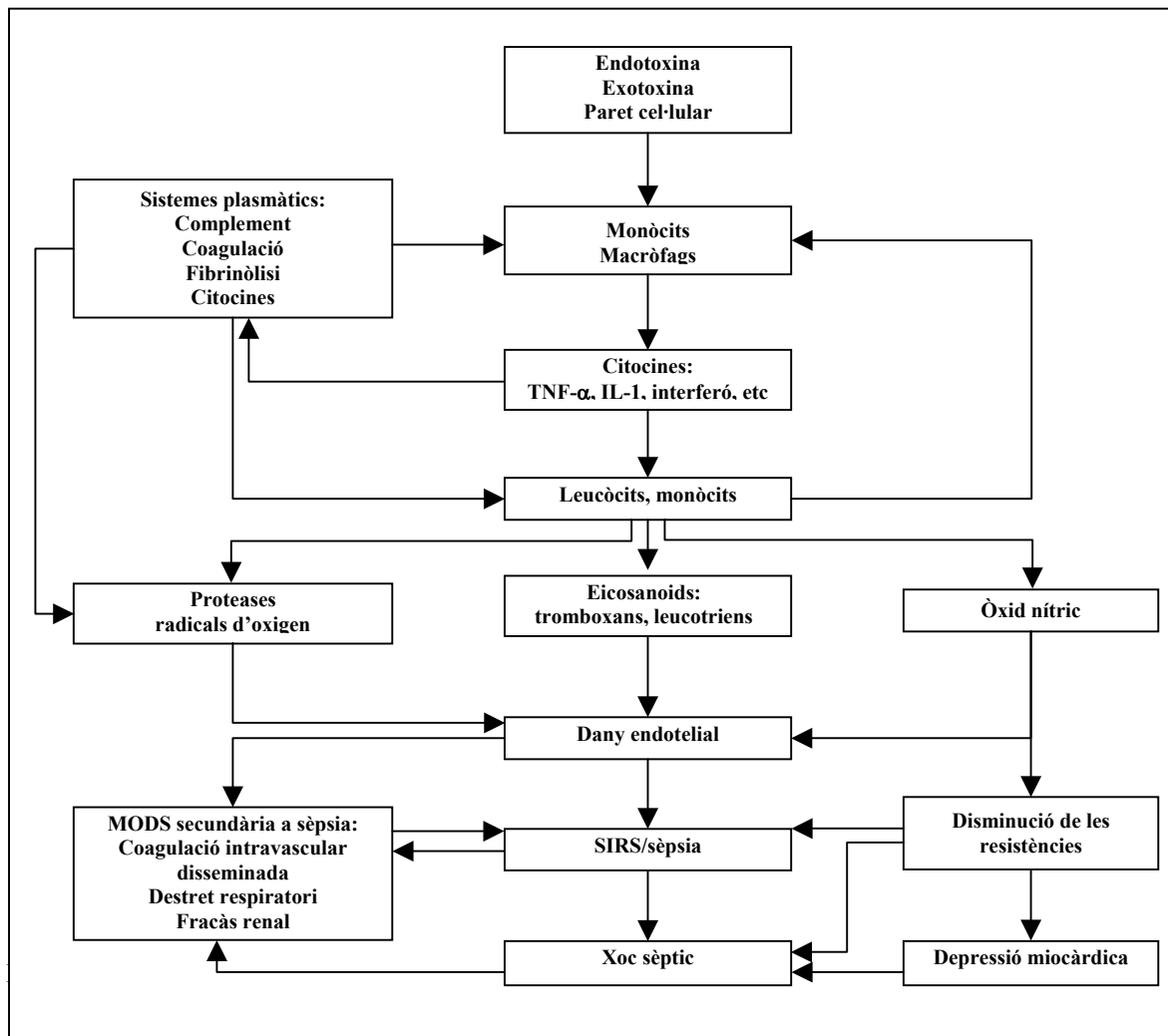
- **Efectes en el fetge**

El TNF- α augmenta l'expressió de proteïnes de fase aguda en els hepatòcits i inhibeix la biosíntesi d'albumina. El TNF- α que és produït per les cèl·lules de Kupffer, és capaç de mitjançar aquests efectes directament o bé, induint citocines secundàries com l'IL-1 i l'IL-6, que poden amplificar aquestes respostes de fase aguda. Pot estimular directament la biosíntesi de lípids circulants i aquest increment en la lipogènesi pot contribuir a la hipertrigliceridèmia, freqüentment observada en la resposta de fase aguda. El TNF- α accelera la ràtio del transport d'aminoàcids mitjançada pel glucagó cap a l'interior dels hepatòcits, segurament com un mecanisme de suport a la major necessitat de substrat del fetge anabòlic. Aquestes respostes mitjançades pel TNF- α promouen la transferència d'aminoàcids des dels teixits perifèrics cap al fetge i poden accelerar les pèrdues de nitrogen observades en situacions catabòliques.

- **Efectes en el sistema cardiovascular**

La principal manifestació de l'alliberació de grans quantitats de TNF- α a la circulació és la hipotensió (xoc) seguida de col·lapse cardiopulmonar. El xoc és causat per diferents efectes mitjançats pel TNF- α que inclouen un descens de la resistència vascular perifèrica, una caiguda del rendiment cardíac i la pèrdua de volum intravascular a través del filtrat capil·lar. El TNF- α activa la síntesi d'òxid nítric en les cèl·lules endotelials; aquesta resposta està implicada tant en el descens del to vascular perifèric com de la funció cardíaca. El TNF- α és extremament tòxic per als pulmons, sent un factor principal en el desenvolupament de la síndrome del destret respiratori en adults (ARDS), una síndrome caracteritzada per edema pulmonar, hipòxia i una alta mortalitat. L'ARDS es produeix perquè el TNF- α indueix activació de l'endoteli pulmonar, marginació dels leucòcits, degranulació dels granulòcits i permeabilitat capil·lar, i dona lloc a la recollida de fluid edematós en els alvèols i impedeix una perfusió i oxigenació adequada.

Figura 1.10. Cadena fisiopatològica en la sèpsia.



▪ **Efectes en la musculatura**

L'exposició dels miòcits al TNF- α dona lloc a una reducció dels potencials transmembrana de repòs i a un increment del sodi intracel·lular. Aquests canvis estan implicats en el segrest de sodi dels compartiments intravasculars (pèrdua del tercer espai) que succeeix en el xoc. Les respostes metabòliques del múscul al TNF- α inclouen una depleció de les reserves de glucogen, un augment de l'efluxió d'aminoàcids amb una pèrdua neta de proteïna, un increment de l'efluxió de lactat i un increment inicial seguit d'una supressió posterior dels transportadors de glucosa.

- **Efectes en el teixit adipós**

El TNF- α estimula la lipòlisi i redueix la transcripció d'alguns enzims clau en la lipogènesi. Per tant, el tractament d'adipòcits amb TNF- α produeix una depleció dels lípids, un bloqueig de la captació lipídica exògena i impedeix la incorporació de glucosa en els lípids sintetitzats *de novo*. Els efectes combinats del TNF- α en els adipòcits i miòcits promou l'alliberació d'aminoàcids, lactat i lípids dels teixits perifèrics per tal d'aportar substrats cap al fetge.

1.5. La immunogenètica de les malalties infeccioses

1.5.1. La influència del component genètic

Les bases genètiques de les tendències familiars observades a diferents malalties infeccioses no s'han definit completament en cap cas particular. Tanmateix, els diferents estudis epidemiològics, de bessons monozigòtics i dizigòtics i familiars indiquen que els factors genètics de l'hoste contribueixen a la susceptibilitat per una malaltia o al tipus de resposta immunològica, tenint en compte que els factors ambientals són també importants i fins i tot crítics per al seu desenvolupament.

Es poden utilitzar diferents mètodes per estimar el grau de contribució genètica de l'hoste a les variacions en la susceptibilitat a malalties infeccioses o en la resposta immunològica a patògens. En la literatura les malalties poligèniques s'expressen freqüentment com un valor λ_S ; aquest factor descriu l'increment en el risc per a una determinada malaltia en bessons comparat amb el risc de la població general. En malalties autoimmunes com la diabetis tipus I o l'esclerosi múltiple aquest valor és de l'ordre de 15-20. El càlcul de λ_S en malalties infeccioses sobreestima la importància de la genètica de l'hoste per raó del major risc d'exposició a la infecció en els membres familiars si es compara amb la població general. L'estimació de λ_S es pot fer a partir d'estudis epidemiològics o d'estudis en bessons i són útils per proporcionar un límit màxim de la probable contribució genètica. Per a la majoria de malalties infeccioses els valors de λ_S se situen entre 1 i 10.

La quantificació de la contribució genètica de l'hoste es pot fer a partir d'estudis de bessons o de nens adoptats. Sorensen i col·laboradors (1988) van realitzar un estudi sobre les causes de mort prematura en 960 famílies amb nens adoptats. Es va estimar el risc dels adoptats de morir de grups diferents de causes abans dels 58 anys d'edat. Els adoptats amb un pare biològic que havia mort abans dels 50 anys per una causa infecciosa tenia un increment en el risc relatiu de 5,8 de morir per causes infeccioses. Contràriament, la mort d'un pare adoptiu per causes infeccioses no tenia efectes significatius en el risc de l'adoptat per a aquest tipus de mort.

S'han fet nombroses comparacions de la concordança per a determinades malalties infeccioses en bessons idèntics i bessons dizigòtics. Una de les malalties més estudiada és la tuberculosi, on s'ha trobat una major concordança en bessons monozigòtics que en dizigòtics (Comstock GW, 1978). En un estudi fet sobre la lepra també es troba una major concordança de la malaltia en bessons monozigòtics (Fine PE, 1981). Exemples més recents també han demostrat una major concordança en la persistència de virus de l'hepatitis B o d'infecció per *Helicobacter pylori* en bessons monozigòtics.

Aquests estudis en bessons s'han utilitzat igualment per estimar el grau de determinació genètica de diverses respostes immunològiques a patògens infecciosos. Jepson i col·laboradors (1997) van dur a terme un estudi comparatiu de les respostes immunològiques a un grup d'antígens de la malària i a la proteïna purificada derivada de micobacteri (PPD) entre bessons de Gàmbia. Es va observar l'existència de marcades diferències tant qualitatives com quantitatives en la resposta immunològica cel·lular i humoral a aquests antígens. Es va trobar una alta heretabilitat de les respostes d'anticossos i proliferatives per a la majoria d'antígens de la malària i per al PPD. La tipificació de l'HLA en bessons va permetre conèixer quina és la contribució genètica dels gens lligats a l'HLA i dels gens que no pertanyen al sistema de l'MHC. Els resultats van mostrar que els efectes de l'MHC eren detectables en la majoria de les respostes immunològiques, tanmateix, la major part de l'efecte genètic en les respostes humorals i cel·lulars era atribuïble a gens no lligats a l'MHC (Sjoberg K i col, 1992).

A més dels estudis esmentats, l'anàlisi de les diferències interpoblacionals en la prevalença de la malaltia és de gran utilitat per identificar els factors genètics que poden tenir un paper dins la malaltia. Per exemple, un estudi recent entre diferents grups ètnics de Burkina Faso ha demostrat l'existència de diferències ètniques en la resposta a la malària.

A més de la informació que proporcionen del grau de determinació gènica en la susceptibilitat a les malalties infeccioses, els estudis familiars també poden suggerir el patró d'herència dels gens de susceptibilitat. Típicament, el patró de transmissió de la malaltia dins les famílies es compara amb diferents models de transmissió utilitzant estimacions del nombre de gens involucrats, les seves freqüències gèniques, i si són dominants, recessius o codominants. La majoria d'aquests estudis han trobat evidències d'un únic gen que afecta la susceptibilitat en els pedigris analitzats. Aquests resultats no es corresponen amb les dades acumulades que indiquen que la susceptibilitat a la majoria de

malalties infeccioses sembla que és altament poligènica. Una explicació podria ser que existeixi un o dos loci predominants que afectin la susceptibilitat amb diferents loci modificadors secundaris.

1.5.2. Estudis d'associació de gens candidats

Hi ha diferents vies per identificar gens associats a malalties. Quan els mecanismes de la malaltia no es coneixen, les anàlisis de lligament de la malaltia en famílies poden permetre la identificació primer del cromosoma i després de la regió del cromosoma on mapa el gen. En el genoma humà existeixen nombrosos marcadors polimòrfics per a cada cromosoma que es fan servir per fer les anàlisis de lligament en famílies i que permeten localitzar els gens associats a la malaltia amb un grau de resolució bastant alt. Clarament, les anàlisis de lligament esdevenen més dificultoses en malalties multigèniques i multifactorials llevat que estiguin presents els efectes d'un únic gen principal.

Una altra via és proposar gens candidats. Això, però, és possible només quan es coneix alguna característica concreta del procés de la malaltia; en aquest sentit el gen candidat és una hipòtesi que caldrà ser testada. De fet, la majoria de gens candidats a afectar la susceptibilitat o la resposta a diferents agents patògens han estat suggerits amb els estudis dels mecanismes immunològics de les malalties infeccioses com per exemple els gens de l'MHC, de les citocines o dels seus receptors, etc.

Finalment, també hi ha alguns exemples de gens identificats en animals que afecten la susceptibilitat dels agents patògens i per tant els seus homòlegs humans esdevenen gens candidats de susceptibilitat a la malaltia.

1.5.2.1. Estudis de l'HLA

Malalties infeccioses com ara la tuberculosi i la lepra van ser molt estudiades en les dècades dels anys 70 i 80. Es van suggerir diferents associacions d'aquestes malalties amb els antígens de classe I, això no obstant, no es va demostrar cap associació consistent. En canvi, l'antigen de classe II HLA-DR2 es va associar amb susceptibilitat tant a la tuberculosi com a la lepra, principalment en població asiàtica (Bothamley GH, 1989). També, en diferents estudis amb població índia es va reconfirmar l'associació de l'antigen HLA-DR2 amb la lepra (Rani R i col·l., 1993).

Els estudis més grans d'associació de l'HLA amb malalties infeccioses s'han fet amb la malària. A Gàmbia l'HLA-B1*5301 i l'HLA-DRB1*1302 es van associar de forma independent amb un menor risc de malària greu en nens (Hill AVS i col·l. 1991). En un estudi similar més recent de malària a Kènya es va trobar una associació protectora amb l'HLA-DRB1*0101 però no amb l'HLA-DRB*5301 ni amb l'HLA-DRB1*1302 (Yates SNR, 1995).

També s'han descrit diferents associacions amb les manifestacions de les infeccions pel virus de l'hepatitis. A Gàmbia, l'HLA-DRB1*1302 es va associar amb una menor persistència del virus de l'hepatitis B (HBV) en els portadors (Thursz M, 1995). Dos estudis a Europa també han demostrat que aquests al·lels o el seu supertipus HLA-DR6 és protector contra l'hepatitis crònica associada amb la persistència de l'HBV (Hohler T i col, 1997; van Hattum J i col·l., 1987). L'HLA també s'ha associat amb l'evolució de les infeccions pel virus de l'hepatitis C (HCV). G. Peano i col·laboradors (1994) i C. Zavaglia i col·laboradors (1996) troben una menor freqüència de l'HLA-DR5 en individus infectats amb HCV amb malaltia crònica en comparació amb malalts asimptomàtics o amb controls sans.

En les infeccions per VIH, nombrosos estudis han demostrat l'associació de diferents al·lels de l'HLA amb diverses manifestacions de la malaltia. Per exemple, l'antigen HLA-B35 i l'haplotip HLA-A1 -B8 i -DR3 s'han associat en diferents ocasions amb una progressió més ràpida de la malaltia (Itescu S i col, 1992; Kaslow RA i col, 1990) mentre que l'HLA-B27 s'ha associat amb una progressió més lenta (Kaslow RA i col, 1996).

1.5.2.2. Les citocines com a gens candidats

Tal com ja s'ha explicat en apartats anteriors, cada tipus cel·lular té un perfil de producció de citocines que li és propi i que varia segons el seu estat d'activació. Les citocines constitueixen una veritable xarxa d'interaccions entre les diferents cèl·lules implicades dins la resposta immunològica. Els processos infecciosos i també les malalties inflamatòries o el rebuig d'òrgans són situacions en el curs de les quals es produeixen modificacions importants en els nivells de producció de citocines. Enfront d'un mateix estímul (infecció, trasplant d'òrgans, etc), les alteracions en el patró de citocines no són idèntiques d'un individu a un altre, i això es pot traduir amb diferències en la susceptibilitat a determinats patògens, diferent resposta immunològica a aquests agents infecciosos, etc.

La variabilitat interindividual en els nivells de producció de cada citocina sovint està lligada a una variabilitat de la seqüència nucleotídica o polimorfisme dels gens que codifiquen per a cada una d'aquestes molècules. L'activació dels gens que codifiquen per les citocines depèn de la unió de proteïnes especialitzades, anomenades factors de transcripció, a les seqüències de DNA reguladores situades cap amunt de la seqüència codificadora, dins la regió promotora. Cada factor de transcripció es fixa a una seqüència de nucleòtids que li és específica, generalment existeixen nombrosos llocs d'unió per als diferents factors de transcripció dins d'un promotor. La modificació d'un sol nucleòtid dins un lloc d'unió pot alterar la fixació del factor de transcripció corresponent i afectar la regulació del gen situat més avall. Això pot donar lloc a diferències quantitatives en la regulació gènica (per exemple un increment en la transcripció del gen) o a diferències qualitatives en la regulació (per exemple, un canvi en la transcripció del gen en resposta a una via de senyalització específica o en un tipus cel·lular particular). Els canvis de nucleòtids que pertanyen a la seqüència codificadora del gen poden comportar la producció d'una proteïna alterada.

1.5.3. Els polimorfismes del gen del TNF- α

La recerca de polimorfismes en els gens de les citocines és un camp relativament nou ja que fa poc més d'una dècada que es disposa de sondes específiques que han permès la identificació d'aquests gens i el coneixement de la seva seqüència.

Els nivells de TNF- α circulants presenten una variabilitat interindividual. Així, s'ha demostrat que l'administració en individus d'un determinat estímul produeix un increment de les concentracions de TNF que pot ser molt més elevada en alguns pacients que en d'altres. A causa de les característiques biològiques i a la seva localització a l'MHC, el TNF va ser un dels primers gens on es va estudiar la possible existència d'al·lels relacionats amb malalties.

1.5.3.1. Localització cromosòmica del gen del TNF- α

El gen del TNF- α es troba en el cromosoma 6p21.3. El TNF- α està ordenat en tàndem amb el gen del TNF- β i està situat en l'anomenada regió de classe III, entre els

gens que codifiquen per a l'HLA de classe II (HLA-DP, DQ i DR) i els de l'HLA de classe I (HLA-A, B i C).

Tota la regió de l'HLA ocupa 4.000 Kb de DNA mentre que la distància entre l'HLA-DR i l'HLA-A és només de 2.000 Kb. Aquestes distàncies relativament curtes, acompanyades possiblement de mecanismes que redueixen la recombinació en aquesta regió, fan que tots els gens d'una cadena de DNA en aquest interval tendeixin a ser heretats *en bloc* com un haplotip. Això es coneix com a desequilibri de lligament genètic el qual implica que els gens d'aquesta regió no segreguen independentment. El desequilibri de lligament comporta l'aparició del que es coneix com a haplotips extensos com per exemple l'haplotip HLA-A1, B8, DR3, associat a nombroses malalties autoimmunes en població caucàsica. Per tant, algú que tingui els antigens HLA-A1 i B8 és molt probable que també tingui l'antigen DR3. El desequilibri de lligament és important ja que també afecta el gen del TNF- α . Determinades variants d'aquest gen estan associades per desequilibri de lligament amb altres gens d'aquesta regió del genoma.

1.5.3.2. Polimorfismes de microsatèl·lit del gen del TNF- α

En el locus del TNF s'ha identificat un clúster de cinc marcadors de microsatèl·lit. Aquests s'han anomenat TNFa, TNFb, TNFc, TNFd i TNFe (Udalova IA i col·l., 1993). El TNFa i el TNFb són repeticions (GT)_n i (GA)_n respectivament, localitzades aproximadament a 3,5 Kb telomèrics del gen TNF- β . El microsatèl·lit TNFc és una repetició (GA)_n localitzada en el primer intró del gen del TNF- β . Els altres dos marcadors, el TNFd i el TNFe, són repeticions (GA)_n i mapen a 8 KB centromèrics del gen del TNF- α (Jongeneel CV i col·l., 1991; Nedospasov SA i col·l., 1991).

Cada microsatèl·lit té diferents al·lels: 14 al·lels per al TNFa mentre que el TNFb, c, d i e en tenen 7, 2, 7 i 3, respectivament. El TNFa té de 99 a 125 repeticions, el TNFb en té 125-131; el TNFc, 159-161; el TNFd, 124-136 i el TNFe, 98-102 (Udalova IA i col·l., 1993).

1.5.3.3. Polimorfismes de canvi d'una base del gen del TNF- α

A la regió situada cap amunt de la seqüència codificadora del gen del TNF- α s'han descrit polimorfismes a les posicions: -1031, -863, -857, -851, -419, -376, -308, -238, -163 i -49 relatius al lloc d'inici de la transcripció. D'aquests, els polimorfismes a la posició

-419, -163 i -49 són rars (Mira JP i col·l., 1999). La majoria d'aquestes variants consisteixen en substitucions $G \rightarrow A$, amb l'excepció del -419 ($G \rightarrow C$), -851 ($C \rightarrow A$), -857 ($C \rightarrow A$), -863 ($C \rightarrow A$) i del -1031 ($T \rightarrow C$). Addicionalment, també s'ha descrit un polimorfisme de fragment de restricció (RFLP) per a l'enzim *NcoI*; aquest, però, està situat en el primer intró del gen del TNF- β (Webb GC i Chaplin DD, 1990).

Un dels polimorfismes més extensament estudiat és el situat en la posició -308 pb. Aquesta variant va ser descrita per AG. Wilson i col·laboradors (1992) i s'ha vist que es correlaciona amb diferències en la transcripció tant constitutiva com induïble del gen. Les dues formes al·lèliques s'anomenen TNFA1 i TNFA2. L'al·lel rar, TNFA2, conté una substitució d'una guanina per una adenina en la posició -308 pb. Els estudis d'expressió del promotor del TNF- α amb el gen "reporter" CAT (*chloramphenicol acetyltransferase*) han demostrat que l'al·lel TNFA2 està associat amb nivells cinc vegades majors de transcripció del gen respecte del TNFA1 (Wilson AG i col·l., 1997; Braun N i col·l., 1996; Kroeger KM i col·l., 1997; Wu WS i McClain KL, 1997) (figura 1.11).

La presència de l'al·lel rar TNFA2 s'ha associat amb un major risc de presència o severitat de diferents processos inflamatoris crònics. W. McGuire i col·laboradors (1994) troben en nens de Gàmbia que els homozigots per a l'al·lel TNFA2 tenen un risc relatiu de 7,7 de mort o de seqüeles neurològiques severes per malària cerebral. Aquesta associació va ser independent de l'HLA. S'han descrit, també, altres associacions de l'al·lel TNFA2, per exemple, en població de Veneçuela s'ha associat amb un major risc de patir leishmaniosi mucocutània i a Gàmbia l'al·lel TNFA2 s'ha associat amb *scarring trachoma* (Cabrera M i col·l., 1995; Conway DJ i col·l., 1997). En un estudi amb 120 pacients amb lepra lepromatosa, una malaltia caracteritzada per la presència d'alts nivells de TNF- α en sèrum, l'al·lel TNFA2 confereix un risc de 3.3 de patir aquesta malaltia, i a més, una associació independent de l'HLA-DR2 és un altre factor de risc conegut (Roy S i col·l., 1997). En un ampli estudi a Vietman, la presència de l'al·lel TNFA2 s'ha associat amb protecció enfront del dengue (Loke H i col·l., 1996). Finalment, l'al·lel TNFA2 s'ha associat amb infecció per virus d'hepatitis B persistent, major mortalitat per meningitis meningocòccica (Nadel S i col·l., 1996) i amb asma (Moffatt MF i col·l., 1997).

En població de l'Europa del nord s'ha descrit l'existència d'un fort desequilibri de lligament entre l'al·lel TNFA2 i l'haplotip HLA-A1, -B8, -DR3 (Wilson AG i col·l., 1993).

Això obre la possibilitat que l'associació haplotípica A1, B8, DR3 amb diferents patologies autoimmunes també pot estar relacionada amb el polimorfisme del TNF- α .

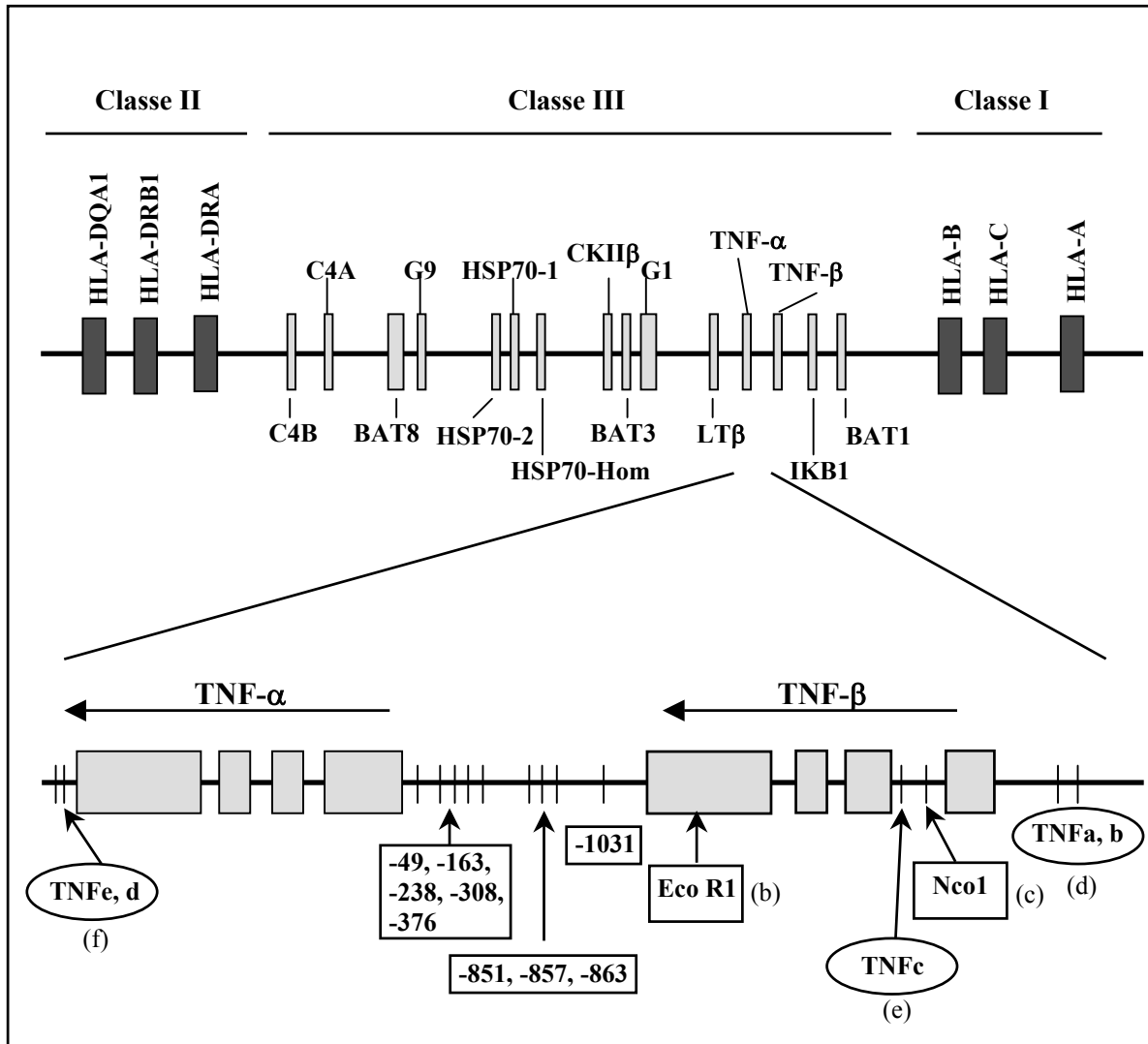


Figura 1.11. Organització genòmica de la regió del Complex Major d'Histocompatibilitat en el braç curt del cromosoma 6. Els gens TNF- α i TNF- β estan en tàndem i cadascun conté quatre exons, la seva situació en relació amb els gens del HLA està indicada. A la figura s'ha representat la posició dels marcadors polimòrfics coneguts: a) els polimorfismes bial·lèlics en el promotor del gen del TNF- α s'han assenyalat amb un rectangle; b, c) polimorfismes de fragment de restricció (RFLP); e, d, f) marcadors microsatèl·lits de longitud variable. BAT1: *HLA-B associated transcript 1*; LT β : linfotoxin β ; BAT3: *HLA-B associated transcript 3*; CKII β : *casein kinase II β* ; HSP70: *heat-shock protein 70*; BAT8: *HLA-B associated transcript 8*; C4A i C4B: components del complement.

PART
II

Hipòtesi

A partir dels coneixements actuals sobre la implicació de les citocines en el desencadenament del part, la nostra hipòtesi és que el complex TNF-TNFR exerceix un important efecte modulador de la resposta inflamatòria directament relacionat amb el part normal i patològic (part amb risc o signes d'infecció). Atès que la relació receptor de membrana i receptor soluble pot modificar-se per diversos estats inflamatoris, la infecció materna, encara que de presentació subclínica, podria determinar un augment de les concentracions de receptors solubles com a conseqüència d'un increment del clivatge dels receptors de membrana. A més a més, la nostra hipòtesi s'amplia cap a un efecte protector dels receptors solubles sobre el fetus. Això és així ja que pensem que el fetus presenta una capacitat constitutiva per a la producció dels receptors del TNF- α que es pot manifestar de forma molt precoç, prèvia al naixement. L'activació del sistema TNF-TNFR pot representar un marcador precoç d'infecció neonatal i, a més, pot determinar-ne l'evolució.

Tal com s'ha exposat a la introducció, les infeccions subclíniques del tracte genital són un factor de risc per al desencadenament del part preterme i per al trencament prematur de les membranes fetals. Tot i que no es coneix el mecanisme pel qual les infeccions subclíniques poden donar lloc a aquestes patologies, sembla que un factor important seria l'augment de les concentracions de citocines proinflamatòries, com el TNF- α , produït per la mare en resposta a les infeccions del tracte genital. En efecte, aquesta citoquina es troba present en altes concentracions en el líquid amniòtic obtingut de dones amb parts prematurs i que presenten infecció de la cavitat amniòtica.

El TNF- α incrementa la producció de les metal·loproteïnases de matriu en una gran varietat de cèl·lules i teixits, incloent les membranes fetals i el cèrvix uterí. Els nivells de metal·loproteïnases de matriu en líquid amniòtic d'humans estan incrementats en associació amb el trencament prematur de membranes. La degradació del col·lagen en les membranes fetals i el cèrvix per les metal·loproteïnases de matriu comporta la ruptura prematura de membranes i dilatació cervical.

Aquestes observacions suggereixen l'existència d'una relació entre la resposta immunoinflamatòria (producció de TNF- α en resposta a les infeccions del tracte vaginal) i el part preterme i la ruptura prematura de membranes.

D'altra banda, el gen del TNF- α mapa en la regió de classe III del MHC i diferents estudis han demostrat que les diferències interindividuals en la producció de TNF- α poden

estar lligades a un tipus d'HLA o a altres marcadors polimòrfics de la regió. Això fa pensar que la producció de TNF- α està controlada per elements genètics variables situats a l'MHC. Un polimorfisme que pot afectar de forma directa la regulació del gen del TNF- α s'ha localitzat a -308 pb relatiu al lloc d'inici de la transcripció del gen. La possessió de l'al·lel rar (TNFA2) s'ha associat amb majors nivells constitutius i induïbles de transcripció.

La nostra hipòtesi consisteix que una determinada població, identificable per la presència de l'al·lel TNFA2, podria constituir un grup de risc per desenvolupar parts preterme o ruptura prematura de membranes preterme com a conseqüència d'una major producció de TNF- α davant d'un estímul mínim (infecció o no) que no produiria aquesta resposta en la resta de la població.

Durant la realització d'aquest estudi es va creure que podria tenir interès analitzar l'efecte que el polimorfisme -308 pb del TNF- α podria tenir en la patogènia de la preeclàmpsia. Per aquest motiu es va incloure un grup addicional de pacients que presentaven aquesta patologia.

La preeclàmpsia es caracteritza per un increment de la pressió arterial, edema i proteïnúria. En alguns casos pot presentar-se afectació hepàtica, del sistema de coagulació, convulsions, coma i mort materna per hemorràgia cerebral. La preeclàmpsia és un factor de risc per a la prematuritat, el retard de creixement intrauterí i de mortalitat perinatal.

Les causes que condueixen a aquesta patologia es desconeixen en l'actualitat, tanmateix, hi ha certes evidències que relacionen la preeclàmpsia amb una alteració materna en la resposta immunològica a l'al·loinjert fetoplacentari. La preeclàmpsia es considera un trastorn endotelial que comporta una disfunció de l'endoteli, una disminució de la síntesi de prostaciclina, un augment de la resistència vascular perifèrica i l'agregació plaquetària.

Les pacients amb preeclàmpsia tenen concentracions elevades de TNF- α en plasma i en líquid amniòtic. Aquesta citocina podria ser la responsable del conjunt d'alteracions que acompanyen aquesta patologia ja que pot actuar com a mitjancer del dany endotelial: a) el TNF- α pot generar radicals d'oxigen reactius que danyen les cèl·lules endotelials; b) el TNF- α pot ser el responsable del desequilibri produït per l'augment del tomboxà A2 i la

disminució de les prostaciclines; c) inhibeix la síntesi d'òxid nítric; d) activa la transcripció de VCAM-1, molècula sobreexpressada en pacients amb preeclàmpsia, que podria ser la responsable de l'activació dels neutròfils característica de la preeclàmpsia; e) el TNF- α estimula l'alliberació de substàncies vasoactives, com l'endotelina, que es presenta incrementada en la preeclàmpsia.

Per tant segons totes aquestes evidències la nostra hipòtesi per a aquest grup va ser que la producció elevada de TNF- α que es detecta en les pacients amb preeclàmpsia podria també estar associada amb el polimorfisme -308 pb del gen del TNF- α que estàvem estudiant en aquest projecte.

III
PART

Objectius

Objectiu general

L'objectiu general és aprofundir en el coneixement de les funcions que el sistema TNF-TNFR desenvolupa en la unitat maternofetal en el part normal i en el part amb risc o signes d'infecció i en la infecció perinatal

L'objectiu general engloba els objectius concrets següents:

Objectiu 1

Analitzar el perfil d'expressió dels receptors del TNF- α p55 i p75 presents en els diferents compartiments de la unitat maternofetal durant el part normal i el part amb risc o signes d'infecció.

Aquest objectiu s'ha dividit en cinc apartats concrets:

- 1.1. Anàlisi de les concentracions dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 en sang perifèrica materna i en sang de cordó presents en el part normal.
- 1.2. Anàlisi de les concentracions dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 en sang perifèrica materna, líquid amniòtic i sang de cordó en el part amb risc o signes d'infecció.
- 1.3. Determinació de l'expressió dels receptors TNFR-p55 i p75 de membrana en cèl·lules limfocitàries obtingudes de sang perifèrica i de sang de cordó durant el part normal.
- 1.4. Comparació de l'expressió dels receptors TNFR-p55 i p75 de membrana en el part normal i el part amb risc o signes d'infecció.
- 1.5. Anàlisi de l'expressió gènica dels receptors TNFR-p55 i p75 en sang perifèrica materna i en sang de cordó.

Objectiu 2

Determinar la concentració plasmàtica de TNF- α i dels seus receptors en nounats amb signes d'infecció i analitzar si la determinació d'aquestes citocines es pot utilitzar com a marcador de sèpsia neonatal precoç i factor pronòstic de l'evolució clínica.

Aquest objectiu s'ha dividit en quatre apartats concrets:

- 2.1. Determinació de les concentracions plasmàtiques de TNF- α .
- 2.2. Determinació de les concentracions plasmàtiques dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75.
- 2.3. Anàlisi de la sensibilitat i de l'especificitat de les concentracions del TNF- α i dels seus receptors solubles com a factor predictiu de sèpsia neonatal.
- 2.4. Anàlisi de la correlació entre la modulació dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 i l'evolució clínica de la sèpsia neonatal.

Objectiu 3

Analitzar la influència del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- α en la prematuritat idiopàtica i en la ruptura prematura de membranes.

Aquest objectiu s'ha dividit en tres apartats concrets:

- 3.1. Determinació de la freqüència del polimorfisme en la població espanyola i la seva associació amb els diferents haplotips del Sistema Major d'Histocompatibilitat de classe I o de classe II.
- 3.2. Anàlisi de l'associació del polimorfisme amb una major susceptibilitat a presentar naixements prematurs espontanis després d'un part preterme idiopàtic o d'una ruptura prematura de les membranes fetals.
- 3.3. En el cas que hi hagi una associació entre el polimorfisme i un major risc de prematuritat, analitzar si aquesta associació pot ser atribuïda a un desequilibri de lligament amb algun al·lel del Sistema Major d'Histocompatibilitat de classe I o de classe II.

IV PART

Resultats

Objectiu 1

Analitzar el perfil d'expressió dels receptors del TNF- α p55 i p75 presents en els diferents compartiments de la unitat maternofetal durant el part normal i el part patològic

4.1.1. Característiques de la població d'estudi

L'estudi va incloure un total de 69 dones les quals es van dividir en tres grups: controls de dones no embarassades, controls de dones amb parts a terme i dones que van presentar risc o signes d'infecció en el moment del part.

El grup control de dones no embarassades va constar de 31 dones donants de sang de l'Hospital Germans Trias i Pujol. El grup de dones embarassades va estar format per un total de 38 pacients, de les quals, en el moment del part es van obtenir de forma simultània mostres de sang perifèrica, líquid amniòtic i les corresponents sangs de cordó. D'aquestes 38 dones, 18 van tenir parts normals a terme i 20 van presentar risc o signes d'infecció en el moment del part.

Adicionalment, es van recollir mostres de sang de cordó tant de parts normals ($n = 8$) com de parts amb risc o signes d'infecció ($n = 9$), i es van obtenir un total de 26 sangs de cordó control i 29 sangs de cordó de nounats amb risc d'infecció. La mediana de l'edat gestacional en el grup control va ser de 39 setmanes (rang de 37 a 41 setmanes) amb un pes de naixement de 3.235 g (rang de 2.570 a 4.100 g), cap dels nadons d'aquest grup no va mostrar signes d'infecció. Dels 29 nounats amb risc d'infecció, 20 van ser nadons a terme i 9 preterme. La mediana de l'edat gestacional d'aquest grup va ser de 39 setmanes (rang de 32 a 41 setmanes) i la del pes de naixement va ser de 3.120 g (rang de 1.440 a 4.260 g). Dos dels nounats amb risc d'infecció van desenvolupar sèpsia dins de les primeres 24 hores de vida (un d'ells amb hemocultiu positiu per *S. agalactiae*) mentre que la resta de nounats del grup no van presentar signes d'infecció.

En el grup de dones amb risc o signes d'infecció es van diagnosticar 7 casos de corioamnionitis per anàlisi histològica i, d'aquest, 4 van ser asimptomàtics. Adicionalment, 1 cas diagnosticat de corioamnionitis clínica no es va confirmar en l'anàlisi histològica. La resta de casos van presentar: ruptura prolongada de membranes, de més de 24 hores, i febre intrapart superior als 38°C ($n = 4$), febre intrapart superior als 38°C ($n = 2$), amnionitis ($n = 1$) i prematuritat ($n = 5$). En aquest grup, tres dones van presentar, a més, colonització vaginal per *S. agalactiae* grup B. Les 9 mostres addicionals de sang de cordó de nounats amb risc d'infecció van correspondre a 4 parts preterme, 3 parts precedits d'una ruptura prematura de membranes de més de 24 hores i 2 parts amb febre materna intrapart superior als 38°C.

4.1.2. Anàlisi de les concentracions dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 en sang perifèrica materna i en sang de cordó presents en el part normal

El primer objectiu d'aquest estudi ha estat determinar si el part normal comporta un increment del clivatge dels receptors del TNF- α i, d'altra banda, si aquests receptors solubles estan restringits a l'organisme matern o bé si el fetus està també exposat al clivatge dels receptors.

La determinació de les concentracions dels receptors solubles del TNF- α es va fer per tècnica d'ELISA, tal com es descriu en l'apartat de materials i mètodes.

Els resultats de la determinació de les concentracions del sTNFR-p55 i p75 obtinguts en sang perifèrica de dones control no embarassades, de dones amb parts normals i de sang de cordó, es descriuen a la taula següent:

Taula 4.1. Concentracions plasmàtiques dels receptors solubles sTNFR-p55 i sTNFR-p75 (ng/ml).

	<i>n</i>	sTNFR-p55 (ng/ml)		sTNFR-p75 (ng/ml)	
		mediana	rang	mediana	rang
Dones control no embarassades	16	1,5	(0,6 - 1,9)	2,7	(2 - 7)
Dones control amb part normal	8	2,4*	(1,5 - 4)	4,2*	(3,6 - 6,3)
Nounats control	26	2,7*	(1,6 - 4,2)	6*	(2,2 - 11)

* $P \leq 0,05$

Totes les pacients analitzades van presentar concentracions detectables d'ambdós receptors solubles, sent l'expressió del sTNFR-p75 major que la del sTNFR-p55 en tots els casos.

L'anàlisi estadística va mostrar que en sang perifèrica de dones amb parts normals hi ha un augment clar de les concentracions d'ambdós receptors solubles respecte al grup control de dones no embarassades (p55: $P < 0,000$; p75: $P < 0,003$). Igualment la sang de cordó dels nadons control va presentar un increment de les concentracions dels dos receptors solubles quan es va comparar amb el grup de dones no embarassades (p55: $P < 0,000$; p75: $P < 0,000$).

4.1.3. Anàlisi de les concentracions dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 en sang perifèrica materna, líquid amniòtic i sang de cordó en el part amb risc o signes d'infecció

Per analitzar si el part amb risc o signes d'infecció comporta un canvi en l'expressió dels receptors solubles, es van comparar les dades de les concentracions obtingudes en sang perifèrica i en líquid amniòtic d'aquest grup de pacients amb les obtingudes de parts normals.

Tal com mostren els resultats descrits a la taula 4.2, es va observar que l'augment de les concentracions de receptors solubles detectat en el part normal incrementa encara més en el part amb risc o signes d'infecció tant en les mostres de sang perifèrica (p55: $P < 0,020$; p75: $P < 0,000$) com en les de líquid amniòtic (p55: $P < 0,004$; p75: $P < 0,03$).

Taula 4.2. Concentracions dels receptors solubles sTNFR-p55 i sTNFR-p75 (ng/ml).

	<i>n</i>	sTNFR-p55 (ng/ml)		sTNFR-p75 (ng/ml)	
		mediana	rang	mediana	rang
<i>Sang perifèrica</i>					
▪ Controls de part normal	8	2,4	(1,5 - 4)	4,2	(3,6 - 6,3)
▪ Dones amb risc o signes d'infecció	17	3,2*	(1,8 - 7,1)	6,6*	(4,5 - 36,2)
<i>Líquid amniòtic</i>					
▪ Controls de part normal	10	3,4	(1,9 - 6,3)	8,2	(2,5 - 13,8)
▪ Dones amb risc o signes d'infecció	18	6*	(2,5 - 12,3)	12,5*	(3,4 - 26,8)

* $P \leq 0,05$

El grup de pacients va incloure dones amb corioamnionitis, risc o signes d'infecció, tal com s'ha comentat en apartats anteriors. L'anàlisi separada dels casos de corioamnionitis va mostrar que el líquid amniòtic tenia una major concentració de receptors solubles en comparació amb el de les pacients sense corioamnionitis (sTNFR-p55: $P < 0,02$; sTNFR-p75: $P < 0,01$) o amb el del grup control (sTNFR-p55: $P < 0,003$; sTNFR-p75: $P < 0,004$) (taula 4.3). Les concentracions plasmàtiques dels receptors solubles també van ser significativament majors en les dones amb corioamnionitis en comparació amb les del grup control (sTNFR-p55: $P < 0,06$; sTNFR-p75: $P < 0,008$). No

obstant això, quan es va comparar el grup de pacients amb corioamnionitis amb les que no n'havien presentat no es va observar cap diferència significativa quant a les concentracions plasmàtiques dels receptors solubles (taula 4.3). Les pacients que no van presentar corioamnionitis continuaven tenint una major concentració plasmàtica dels receptors solubles respecte del grup control (sTNFR-p55: $P < 0,05$; sTNFR-p75: $P < 0,001$), mentre que en líquid amniòtic només el sTNFR-p55 va mostrar que estava significativament augmentat ($P < 0,002$). Els valors de les concentracions dels receptors solubles en els diferents grups es detallen a continuació:

Taula 4.3. Concentracions dels receptors solubles sTNFR-p55 i sTNFR-p75 (ng/ml).

	<i>n</i>	sTNFR-p55 (ng/ml)		sTNFR-p75 (ng/ml)	
		mediana	rang	mediana	rang
<i>Sang perifèrica</i>					
▪ Dones control amb part normal	8	2,4	(1,5 - 4)	4,2	(3,6 - 6,3)
▪ Pacients corioamnionitis	8	3,2*	(2,5 - 3,5)	8,1*	(5,6 - 8,8)
▪ Pacients no-corioamnionitis	9	3,05*	(1,8 - 7,1)	6,6*	(4,5 - 36,2)
<i>Líquid amniòtic</i>					
▪ Dones control amb part normal	10	3,4	(1,9 - 6,3)	8,2	(2,5 - 13,8)
▪ Pacients corioamnionitis	8	7,5*	(6,1 - 9,2)	19,4*	(12 - 26,8)
▪ Pacients no-corioamnionitis	10	5,5*	(2,5 - 12,3)	9,7	(3,4 - 24)

* $P \leq 0,05$

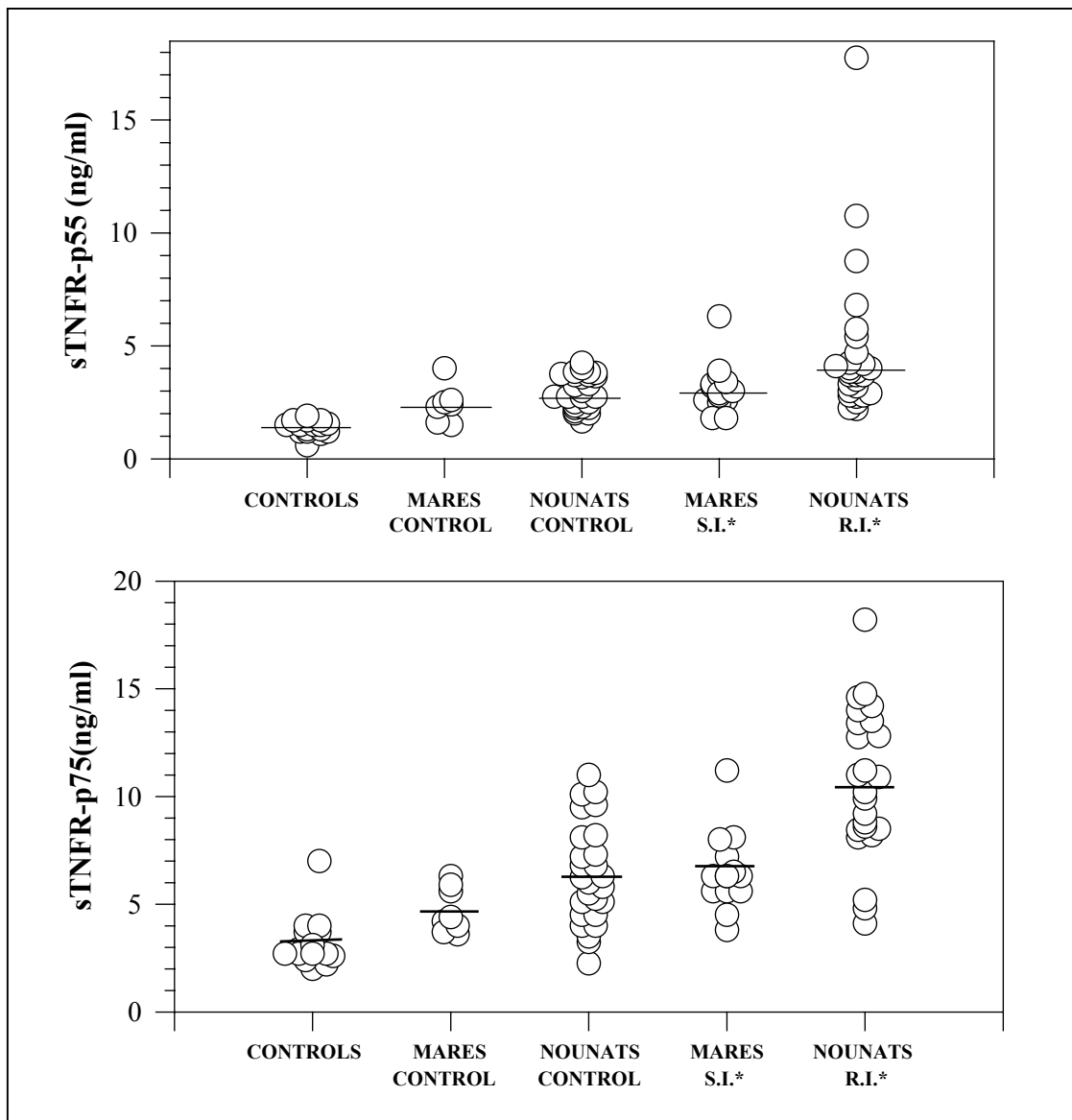
En sang de cordó de nounats amb risc d'infecció, la concentració d'ambdós receptors va ser major que la detectada en sang de cordó de nounats control (p55: $P < 0,001$; p75: $P < 0,000$) (taula 4.4).

Taula 4.4. Concentracions plasmàtiques dels receptors solubles sTNFR-p55 i sTNFR-p75 (ng/ml).

	<i>n</i>	sTNFR-p55 (ng/ml)		sTNFR-p75 (ng/ml)	
		mediana	rang	mediana	rang
Nounats control	26	2,7	(1,6 - 4,2)	6	(2,2 - 11)
Nounats amb risc d'infecció	29	3,8*	(2,2 - 18,2)	10,2*	(4,1 - 18,2)

* $P \leq 0,05$

Figura 4.1. Concentracions plasmàtiques individuals dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 en tots els grups.



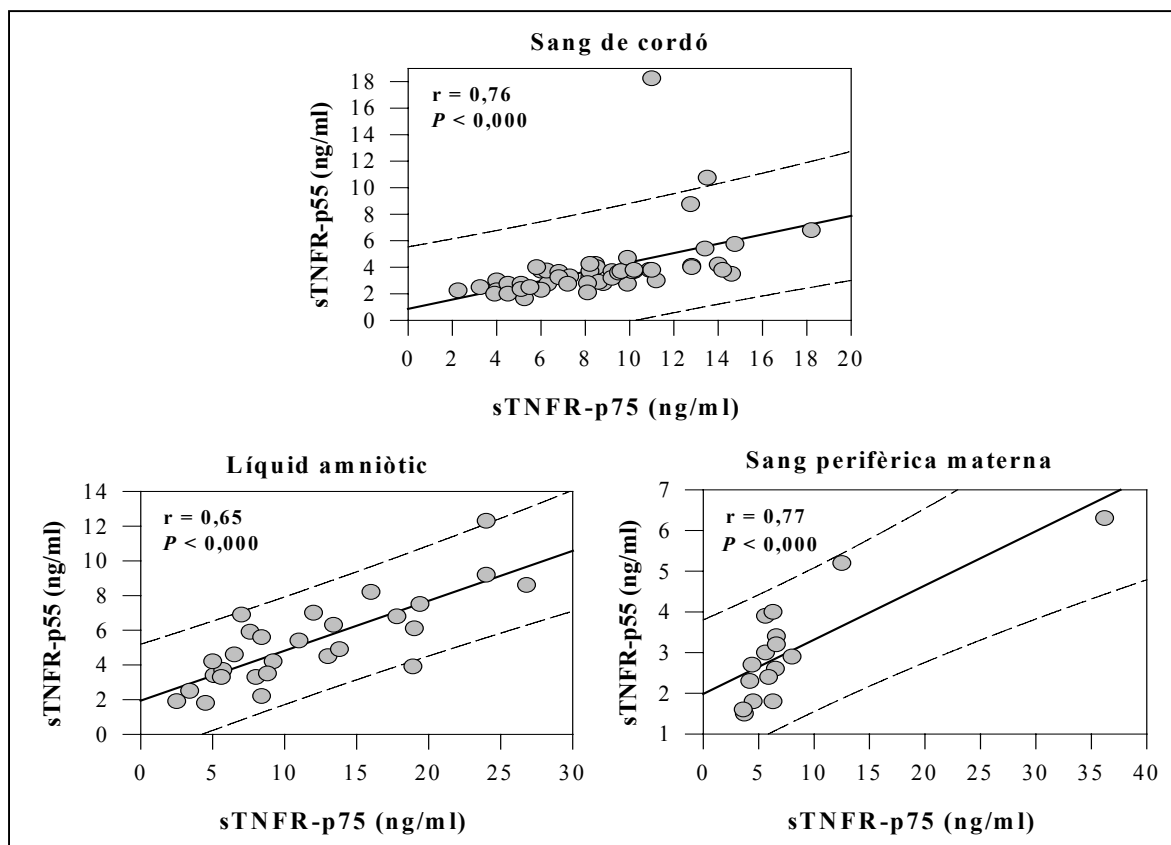
Les línies curtes representen les medianes de les concentracions dels receptors sTNFR-p55 i p75 en cadascun dels grups analitzats. *S.I, signes d'infecció; *R.I, risc d'infecció.

No es van trobar diferències quant a les concentracions dels receptors solubles entre els nounats amb risc d'infecció prematurs ($n = 9$) i els nounats amb risc d'infecció a terme ($n = 20$). Les concentracions dels receptors solubles obtingudes de sang perifèrica i de líquid amniòtic tampoc no van ser diferents entre dones amb parts preterme ($n = 5$) i a terme ($n = 15$). En el grup de nadons amb risc d'infecció, no es va observar cap diferència significativa en les concentracions plasmàtiques dels receptors solubles entre els nounats de mares amb corioamnionitis i els de mares que no van presentar corioamnionitis.

Cal destacar que les concentracions plasmàtiques més elevades de receptor sTNFR-p55 les van presentar dos nounats amb risc d'infecció que van desenvolupar sèpsia (10,7 ng/ml i 18,2 ng/ml, respectivament); en aquests dos casos les concentracions del receptor sTNFR-p75 van ser de 13,5 ng/ml i 11 ng/ml, respectivament.

En tots els grups analitzats es va observar una correlació positiva entre les concentracions dels receptors sTNFR-p55 i p75 tant en sang perifèrica materna ($r = 0,65$, $P < 0,000$; Spearman ρ), com en líquid amniòtic ($r = 0,77$, $P < 0,000$; Spearman ρ) i en sang de cordó ($r = 0,76$, $P < 0,000$; Spearman ρ) (figura 4.2). No obstant això, no es va observar cap correlació significativa en les concentracions de cadascun dels receptors entre els diferents compartiments.

Figura 4.2. Correlacions entre les concentracions dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75.

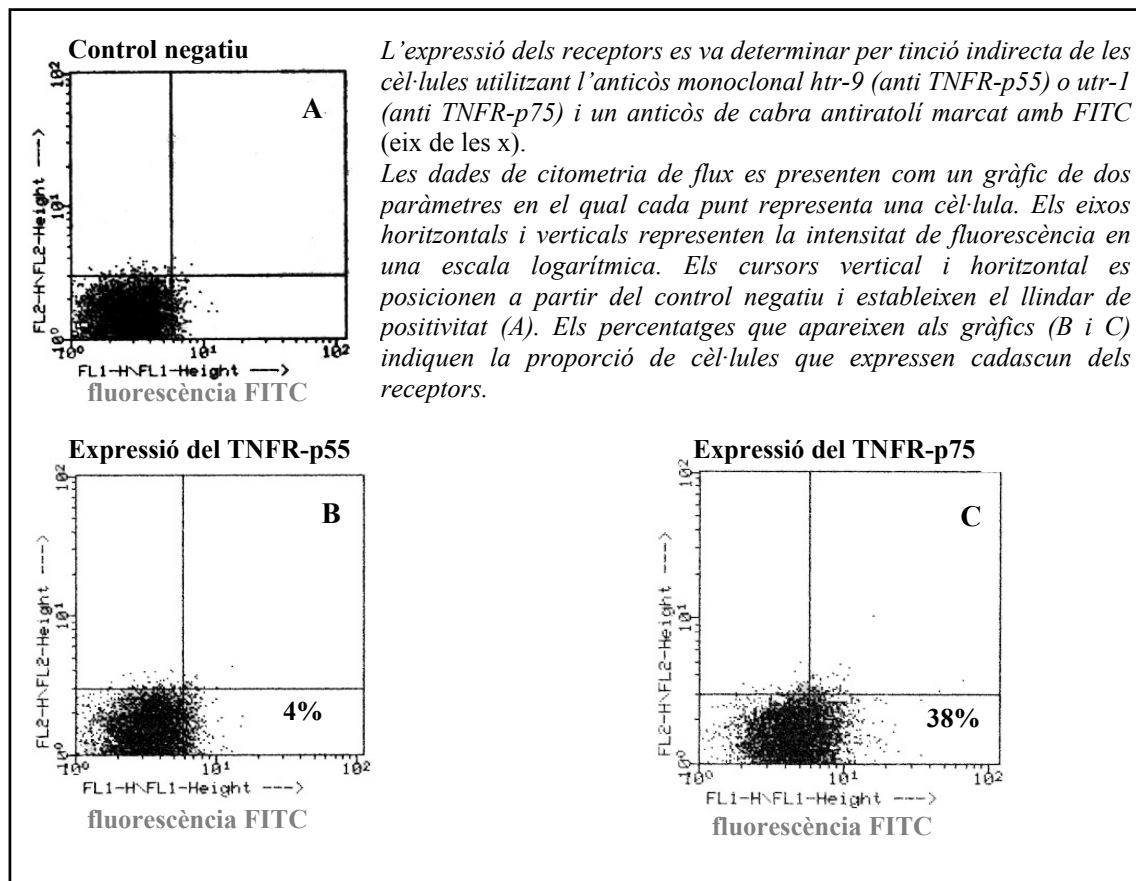


Les línies de predicció (- - -) corresponen als intervals de confiança del 95%.

4.1.4. Determinació de l'expressió dels receptors TNFR-p55 i p75 de membrana en cèl·lules limfocitàries obtingudes de sang perifèrica i de sang de cordó durant el part normal

L'expressió dels dos receptors de membrana del TNF- α (TNFR-p55 i TNFR-p75) en cèl·lules limfocitàries, obtingudes de sang perifèrica materna i de sang de cordó, es va analitzar mitjançant la tècnica de citometria de flux (figura 4.3).

Figura 4.3. Exemple d'una anàlisi per citometria de flux de l'expressió dels receptors de membrana del TNF- α en cèl·lules limfocitàries de sang perifèrica.



- **Validació de la tècnica de citometria de flux**

Abans de procedir a l'anàlisi de les mostres es van realitzar diferents experiments per validar la tècnica en sang total. En primer lloc es va comprovar en quin tipus de mostres era més fiable la mesura dels receptors de membrana. Per això es van comparar

tincions en sang total no fraccionada i en PBMC aïllats amb gradient de Ficoll. Els experiments realitzats van mostrar que en tots els casos l'expressió dels receptors era major en sang total que en les mostres aïllades amb Ficoll (taula 4.5). Aquests resultats indicaven que en el procés d'aïllament cel·lular amb gradient de Ficoll es produïa una pèrdua de receptors de membrana, probablement a causa de l'activació del seu clivatge i, que per tant, la mesura en sang total era més fiable.

Taula 4.5. Resultats de la comparació de la tinció amb l'anticòs utr-1 entre sang total i PBMC aïllats amb gradient de Ficoll.

mostra 1 (%cèl·l.)		mostra 2 (%cèl·l.)		mostra 3 (%cèl·l.)		mostra 4 (%cèl·l.)	
S. total ¹	PBMC ²	S. total ¹	PBMC ²	S. total ¹	PBMC ²	S. total ¹	PBMC ²
14,9%	4,7%	12,3%	2,7%	6,3%	1,3%	9,9%	2,7%
15,6%	5,2%	13,9%	3,1%	5,8%	1,8%	8,7%	3,5%

Cada tinció es va fer per duplicat. ¹: sang total; ²: PBMC aïllats amb gradient de Ficoll.

Posteriorment es va determinar la fiabilitat de la tècnica de tinció en sang total per la qual cosa es van fer, per a cada anticòs, cinc experiments per triplicat i se'n va determinar el coeficient de variació (taula 4.6). Tant en la tinció amb l'anticòs htr-9 com amb l'utr-1, els coeficients de variació no van excedir en cap cas el 20%.

Taula 4.6. Resultats de validació de la tècnica de citometria de flux en sang total per l'anticòs utr-1.

	mostra 1 (%cèl·l.)	mostra 2 (%cèl·l.)	mostra 3 (%cèl·l.)	mostra 4 (%cèl·l.)	mostra 5 (%cèl·l.)
	24,1%	21,6%	21,6%	15,5%	34,4%
	25,7%	28,2%	28,4%	13,9%	35%
	25,5%	28%	19,4%	14,9%	31,8%
mitjana	25,1%	25,9%	23,1%	14,8%	33,7%
DS	0,7	3	3,8	0,69	1,38
%CV	2,8%	11,5%	16%	4,7%	4%

DS: desviació estàndard; CV: coeficient de variació.

▪ Resultats de l'anàlisi de les mostres

Hi ha diferents aspectes de la immunologia durant la primera etapa de la vida que es coneixen poc; en concret no està ben descrit quina és la capacitat de les cèl·lules immunològiques neonatals per produir citocines ni el grau d'expressió dels seus receptors. Al mateix temps, tampoc no es coneixen bé quins canvis immunològics es produeixen durant la gestació. Els resultats de l'apartat anterior van determinar que en el part normal es produeix un increment de les concentracions de receptors solubles del TNF- α en tots els compartiments de la unitat maternofetal. El següent objectiu va ser determinar si aquest increment dels receptors solubles anava acompanyat d'una major expressió dels receptors de membrana en les cèl·lules de sang perifèrica materna i determinar l'origen dels receptors solubles en la sang de cordó.

En tots els casos analitzats, les cèl·lules limfocitàries van presentar una expressió constitucional predominant del receptor TNFR-p75 respecte del receptor TNFR-p55.

L'anàlisi dels receptors de membrana va mostrar un patró d'expressió invers al dels receptors solubles. En el part normal el percentatge d'expressió en sang materna i en sang de cordó del receptor TNFR-p75 va ser menor que el del grup de dones no embarassades (p75: $P < 0,006$ i $P < 0,000$, respectivament). El receptor TNFR-p55 també va mostrar una menor expressió en les mostres obtingudes de dones amb parts normals i en les de sang de cordó, si bé aquestes diferències no van assolir la significació estadística (taula 4.7).

Taula 4.7. Expressió dels receptors TNFR-p55 i TNFR-p75 de membrana en cèl·lules limfocitàries.

	<i>n</i>	TNFR-p55 (%cèl·l.)		TNFR-p75 (%cèl·l.)	
		mediana	rang	mediana	rang
Dones control no embarassades	31	3%	(0,5 - 37)	23%	(2 - 69,2)
Dones control amb part normal	18	1,5%	(0,9 - 9,7)	7,8%*	(1,9 - 29)
Nounats control	18	1,9%	(0,4 - 6,4)	4,7%*	(1,8 - 14,9)

* $P \leq 0,05$

4.1.5. Comparació de l'expressió dels receptors de membrana TNFR-p55 i p75 en el part normal i en el part amb risc o signes d'infecció

Quan vam comparar els resultats obtinguts en el grup de pacients amb els del grup control es va observar que en presència de signes o risc d'infecció es tendeix a una major expressió d'ambdós receptors de membrana. Aquest augment de l'expressió va ser estadísticament significatiu només per al receptor TNFR-p55 ($P < 0,03$). Aquests resultats es van repetir quan es va analitzar el grup de mostres de sang de cordó, on els nounats amb risc d'infecció també van presentar un increment de l'expressió del receptor TNFR-p55 ($P < 0,04$) (taula 4.8).

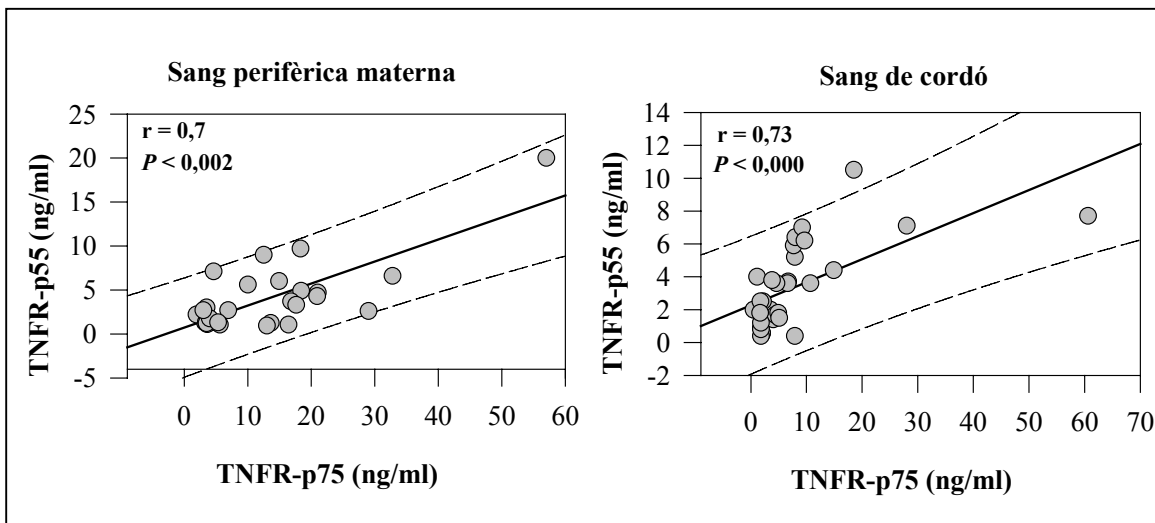
Taula 4.8. Expressió dels receptors TNFR-p55 i p75 de membrana en cèl·lules limfocitàries.

	n	TNFR-p55 (%cèl·l.)		TNFR-p75 (%cèl·l.)	
		mediana	rang	mediana	rang
Dones control amb part normal	18	1,5%	(0,9 - 9,7)	7,8%	(1,9 - 29)
Dones amb risc o signes d'infecció	10	4%*	(1,3 - 20)	17,2%	(3 - 57)
Nounats control	18	1,9%	(0,4 - 6,4)	4,7%	(1,8 - 14,9)
Nounats amb risc d'infecció	13	3,8%*	(0,8 - 10,5)	3,8%	(0,5 - 60,6)

* $P \leq 0,05$

L'expressió del receptor TNFR-p55 es va correlacionar positivament amb la del receptor TNFR-p75 tant en sang perifèrica materna ($r = 0,7$, $P < 0,002$; Spearman ρ), com en sang de cordó ($r = 0,73$, $P < 0,000$; Spearman ρ) (figura 4.4.). No es va trobar cap correlació significativa en l'expressió de cada un dels receptors entre sang perifèrica materna i les corresponents sangs de cordó. Tampoc no es va observar una correlació entre la concentració plasmàtica de receptors solubles i el nivell d'expressió d'aquests receptors de membrana en cèl·lules limfocitàries.

Figura 4.4. Correlacions entre els receptors de membrana TNFR-p55 i TNFR-p75.



Les línies de predicció (- - -) corresponen als intervals de confiança del 95%.

4.1.6. Estudi de l'expressió gènica dels receptors TNFR-p55 i p75 en sang perifèrica materna i en sang de cordó

Per analitzar si l'expressió dels transcrits dels receptors del TNF- α podia veure's afectada per un estímul inflamatori i al mateix temps determinar la capacitat de les cèl·lules del sistema immunològic dels nounats per produir aquests receptors, es va analitzar l'expressió de l'mRNA dels receptors TNFR-p55 i p75 amb la tècnica de Northern blot en un grup de 14 mostres de sang materna i en les corresponents mostres de sang de cordó. De les 14 mostres analitzades de sang materna, 7 van ser mostres control de dones amb parts a terme i les altres 7 de dones amb parts amb signes d'infecció.

Es va detectar mRNA específic tant del receptor TNFR-p55 com del p75 en totes les mostres analitzades, la qual cosa indica que l'expressió d'aquests receptors és constitutiva tant en les cèl·lules de sang perifèrica materna com en les cèl·lules de nounats (figura 4.5). Cal destacar que l'expressió d'aquests receptors va ser en tots els casos inferior en les mostres de sang de cordó en comparació amb les de les mares. La mitjana de l'increment d'expressió en sang perifèrica materna respecte a la sang de cordó va ser de 37,9% (12,3% a 135,5%) per al receptor TNFR-p55 i de 33,4% (13,3% a 125%) per al receptor TNFR-p75.

Quan es van comparar els resultats entre els dos grups de pacients no es van observar diferències en el grau d'expressió dels receptors entre les mostres de sang perifèrica de dones amb parts normals i les que havien presentat risc o signes d'infecció. L'anàlisi de les mostres de sang de cordó tampoc no va mostrar una expressió dels receptors del TNF- α diferent entre els controls i els nounats amb risc d'infecció.

Finalment, l'expressió de cadascun dels gens (TNFR-p55 i p75) es va comparar amb els corresponents nivells d'expressió proteica tant en la forma de membrana com en la de receptors solubles. L'anàlisi estadística va mostrar que no hi ha cap correlació entre els nivells de proteïna i d'mRNA dels receptors. Les dades de l'expressió de l'mRNA dels receptors de membrana i les concentracions dels receptors solubles de cada pacient es detallen a la taula 4.9.

Taula 4.9. Dades individualitzades de cadascun dels marcadors analitzats en sang perifèrica materna i en les corresponents sangs de cordó.

		TNFR-p55			TNFR-p75		
		mRNA*	membrana (%cèl·l.)	soluble (ng/ml)	ARNm*	membrana (%cèl·l.)	soluble (ng/ml)
P#1	mare	0,62	3,5%	2,6	0,4	11,5%	7,2
	cordó	0,089	7,7%	4,1	0,032	60,6%	12,8
P#2	mare	1,905	1,3%	2,9	0,817	5,3%	8
	cordó	0,149	3,6%	5,4	0,169	10,7%	13,4
P#3	mare	0,364	1,3%	2,5	0,295	3,2%	4,2
	cordó	0,293	7,1%	3	0,158	28%	11,2
P#4	mare	0,471	0,3%	3,5	0,608	2%	8,8
	cordó	0,301	0,9%	3,8	0,073	1,8%	10,2
P#5	mare	0,668	4,9%	3,7	0,826	18,4%	6,6
	cordó	0,178	2%	3,8	0,157	0,5%	14,2
P#6	mare	15	20%	3,2	3,746	57%	5,6
	cordó	1,107	10,5%	3,8	1,013	18,5%	10,9
P#7	mare	4,617	3,7%	6,3	2,187	16,8%	36,2
	cordó	1,23	2,5%	6,8	1,006	1,7%	18,2
P#8	mare	4,91	1,25%	1,5	3,19	13,6%	3,7
	cordó	0,843	3,7%	3,8	1,03	6,7%	11
P#9	mare	8,85	3,3%	1,8	6,5	17,6%	6,3
	cordó	2,31	1,2%	2,8	1,76	1,8%	8,1
P#10	mare	0,106	2,7%	3,3	0,183	6,9%	8,8
	cordó	0,086	0,8%	2,2	0,077	1,8%	4,8
P#11	mare	0,378	2,7%	3,4	0,116	3%	6,6
	cordó	0,102	4%	3,3	0,087	1,1%	8,2
P#12	mare	0,68	1,3%	4	0,199	4,5%	6,3
	cordó	0,11	5,9%	2,1	0,063	7,7%	8,1
P#13	mare	0,407	6,6%	1,8	0,24	32,8%	4,5
	cordó	0,125	3,8%	3,7	0,07	3,8%	8,2
P#14	mare	9,85	4,3%	3,9	4,63	20,9%	5,6
	cordó	2,185	7%	2,9	1,426	9,2%	8,6

* Les dades de l'mRNA dels receptors representen la ràtio entre els píxels de la banda del TNFR-p55 o la del p75 i els de la banda de l'mRNA ribosòmic 28S corresponent després de normalitzar-ho respecte d'un de control, tal com es detalla a l'apartat de material i mètodes. L'mRNA control utilitzat per a la normalització es va aïllar de la línia cel·lular HL60.

Figura 4.5. Exemple d'una anàlisi de Northern Blot.

